

Charakterisierung von pulmonaler Hypertonie bei Lungenkrebs

SAMANTHA STORN



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2013

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2013

© 2013 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen

Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem
Institut für Veterinärphysiologie
Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Joachim Roth

und

dem Zentrum für Innere Medizin
Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Ralph Schermuly

Charakterisierung von pulmonaler Hypertonie bei Lungenkrebs

INAUGURALDISSERTATION
Zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
an der Justus-Liebig-Universität

eingereicht von

Samantha Storn

Tierärztin aus Ettelbruck, Luxemburg

Gießen 2013

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität-Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Joachim Roth
Prof. Dr. rer. nat. Ralph Schermuly

Tag der Disputation: 18. Juni 2013

Meinen Eltern

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Samantha Storn, Gießen 2013

Ergebnisse dieser Arbeit wurden anhand von Postern präsentiert:

Characterization of pulmonary hypertension in lung cancer. Storn S *et al.*
(Deutsches Zentrum für Lungenforschung (DZL) Annual Meeting, Bad Nauheim,
2013)

Characterization of pulmonary hypertension in lung cancer. Storn S *et al.*
(American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting, Washington,
D.C., 2013)

Verzeichnisse

Inhaltsverzeichnis.....	i
Tabellenverzeichnis.....	v
Abbildungsverzeichnis.....	vi
Abkürzungsverzeichnis	viii

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Lungenkrebs.....	1
1.1.1	Definitionen.....	1
1.1.2	Vorkommen	1
1.1.3	Klassifikation.....	2
1.1.3.1	Pathologische Klassifikation	2
1.1.3.2	TNM-Klassifikation	6
1.1.4	Pathophysiologie	7
1.1.4.1	Initiation.....	7
1.1.4.2	Promotion.....	8
1.1.4.3	Progression	9
1.1.4.4	Invasion und Metastasierung	10
1.1.5	Tumorstroma	11
1.1.5.1	Angiogenese	12
1.1.5.2	Entzündungszellen.....	13
1.1.6	Therapie	17
1.1.7	Lungentumormodelle.....	18
1.1.7.1	Lewis Lung Carcinoma 1-Lungentumormodell	18
1.1.7.2	K-ras ^{LA2} -Lungentumormodell	19
1.1.7.3	SP-C-c-raf-1-BxB-23-Lungentumormodell.....	22
1.2	Pulmonale Hypertonie	24
1.2.1	Definition.....	24
1.2.2	Vorkommen	24
1.2.3	Klassifikation.....	25
1.2.4	Pathophysiologie	26
1.2.5	Therapie	30

1.2.6	Immunzellen bei pulmonaler Hypertonie	31
1.2.6.1	T-Lymphozyten	32
1.2.6.2	Makrophagen	33
1.2.6.3	Dendritische Zellen	33
1.3	Vom Lungentumor zur pulmonalen Hypertonie	34
1.3.1	Thrombembolien	34
1.3.2	Tumorzellembolien	36
1.4	Ziel der Arbeit	39
2	Material und Methoden	40
2.1	Material	40
2.1.1	Versuchstiere	40
2.1.2	Tierversuchsgenehmigung	41
2.1.3	Humanes Donormaterial	41
2.1.3.1	Ethische Stellungnahme	41
2.1.3.2	Patientenangaben	42
2.1.4	Material und Geräte für Zellkultur	43
2.1.4.1	Verbrauchsmaterialien	43
2.1.4.2	Zellen, Medien und Substanzen	43
2.1.4.3	Systeme und Geräte	44
2.1.5	Material und Geräte für Tierexperimente	44
2.1.5.1	Verbrauchsmaterialien	44
2.1.5.2	Injektionslösungen und Substanzen	46
2.1.5.3	Systeme und Geräte	46
2.1.6	Material und Geräte für Histologie	48
2.1.6.1	Verbrauchsmaterialien	48
2.1.6.2	Lösungen, Kits und Antikörper	48
2.1.6.3	Systeme und Geräte	51
2.2	Methoden	52
2.2.1	Kultur von Lewis Lung Carcinoma 1-Zellen	52
2.2.1.1	Subkultivierung und Trypsinierung	52
2.2.1.2	Kryokonservierung	53
2.2.1.3	Revitalisierung	54
2.2.2	Intravenöse Applikation von LLC1-Zellen in die laterale Schwanzvene	55
2.2.2.1	Vorbereitung der LLC1-Zellsuspension	55
2.2.2.2	Intravenöse Injektion in die laterale Schwanzvene	56
2.2.3	Echokardiographie	57
2.2.3.1	Aufteilung der Tiergruppen	57

2.2.3.2	Zeitpunkt der echokardiographischen Untersuchungen	58
2.2.3.3	Echokardiographische Verlaufskontrolle und erhobene Parameter	60
2.2.4	Hämodynamische Messung am Ganztier	63
2.2.4.1	Vorbereitung und Narkose	63
2.2.4.2	Messungen des systolischen rechtsventrikulären Blutdrucks und des systemisch arteriellen Blutdrucks.....	64
2.2.4.3	Auswertung des aufgezeichneten systemisch arteriellen und systolisch rechtsventrikulären Blutdrucks.....	66
2.2.4.4	Probenentnahme	66
2.2.5	Histologie	68
2.2.5.1	Fixierung der entnommenen Organproben	68
2.2.5.2	Entwässerung, Einbetten und Schneiden des Gewebes.....	69
2.2.5.3	Färbeprotokolle	70
2.2.6	Histologische Auswertung	79
2.2.6.1	Bestimmung des Tumor-Areals und Nicht-Tumor-Areals.....	79
2.2.6.2	Anzahl der vermessenen Gefäße	80
2.2.6.3	Morphometrische Analyse der medialen Wandstärke	80
2.2.6.4	Morphometrische Analyse des Muskularisierungsgrades	81
2.2.6.5	Bestimmung der vaskulären Zellzahlen CD3-, CD68- und CD209- positiver Zellen	82
2.2.6.6	Analyse des Kollagengehalts des rechten Ventrikels.....	82
2.2.7	Statistische Auswertung	83
3	Ergebnisse	84
3.1	Tierexperimentelle Studien.....	84
3.1.1	LLC1-Lungentumormodell.....	84
3.1.1.1	Allgemeinbefinden und klinische Befunde	84
3.1.1.2	Echokardiographie	86
3.1.1.3	Invasive Untersuchung	89
3.1.1.4	Histologische Auswertung	92
3.1.2	K-ras ^{LA2} -Lungentumormodell.....	97
3.1.2.1	Allgemeinbefinden und klinische Befunde	97
3.1.2.2	Echokardiographie	98
3.1.2.3	Invasive Untersuchung	101
3.1.2.4	Histologische Auswertung	104
3.1.3	SP-C-c-raf-BxB-23-Lungentumormodell	109
3.1.3.1	Allgemeinbefinden und klinische Befunde	109
3.1.3.2	Echokardiographie	111

3.1.3.3	Invasive Untersuchung	114
3.1.3.4	Histologische Auswertung	117
3.2	Humane histologische Studie	122
3.2.1	Histologische Begutachtung	122
3.2.2	Gefäßmorphometrie	123
3.2.3	Quantifizierung von Immunzellen in den pulmonalen Gefäßwänden.....	128
3.2.3.1	Quantitative Bestimmung CD3-positiver T-Lymphozyten.....	128
3.2.3.2	Quantitative Bestimmung CD68-positiver Makrophagen.....	131
3.2.3.3	Quantitative Bestimmung CD209-positiver dendritischer Zellen	133
4	Diskussion.....	135
4.1	Wahl der Tiermodelle	135
4.1.1	Lewis Lung Carcinoma 1-Lungentumormodell.....	136
4.1.2	K-ras ^{LA2} -Lungentumormodell.....	138
4.1.3	SP-C-c-raf-1-BxB-23-Lungentumormodell	139
4.2	Auswirkung der Lungentumoren auf die Hämodynamik	140
4.3	Auswirkung der Lungentumoren auf die kardiale Funktion	143
4.4	Auswirkung der Lungentumoren auf die Blutoxygenierung und den Hämatokrit	150
4.5	Auswirkung der Lungentumoren auf die Gefäßmorphometrie	153
4.6	Mögliche beteiligte Mechanismen	157
4.7	Klinische Bedeutung und Ausblick	164
5	Zusammenfassung	167
6	Summary	169
7	Literaturverzeichnis.....	171
8	Danksagung	188

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Histologische Klassifikation von Lungenkrebs	3
Tabelle 1.2: 7. Edition der TNM-Klassifikation des American Joint Committee on Cancer	6
Tabelle 1.3: Klassifikation der pulmonalen Hypertonie	25
Tabelle 2.1: In den Tierexperimenten verwendete Mauslinien.....	41
Tabelle 2.2: Patientendaten zu den verwendeten Proben	42
Tabelle 2.3: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien für Zellkultur	43
Tabelle 2.4: Übersicht der verwendeten Zellen, Medien und Substanzen für Zellkultur	43
Tabelle 2.5: Übersicht der verwendeten Systeme und Geräte für Zellkultur	44
Tabelle 2.6: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien für Tierexperimente	44
Tabelle 2.7: Übersicht der verwendeten Injektionslösungen und Substanzen für Tierexperimente	46
Tabelle 2.8: Übersicht der verwendeten Systeme und Geräte für Tierexperimente	46
Tabelle 2.9: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien für Histologie	48
Tabelle 2.10: Übersicht der verwendeten Lösungen, Kits und Antikörper für Histologie	48
Tabelle 2.11: Übersicht der verwendeten Systeme und Geräte für Histologie	51
Tabelle 2.12: Färbeprotokoll der Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	70
Tabelle 2.13: Färbeprotokoll der Elastica-van Gieson-Färbung.....	71
Tabelle 2.14: Färbeprotokoll der Anti- α -Aktin/Anti-von Willebrand-Faktor-Doppelfärbung für murines Lungengewebe	72
Tabelle 2.15: Färbeprotokoll der Anti- α -Aktin/Anti-von Willebrand-Faktor-Doppelfärbung für humanes Lungengewebe	74
Tabelle 2.16: Färbeprotokoll der Anti-CD3-Färbung auf humanem und murinem Lungengewebe	76
Tabelle 2.17: Färbeprotokoll der Sirius-Red-Färbung	78

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Wachstumsmuster invasiver Adenokarzinome	4
Abbildung 1.2: Der zelluläre Aufbau solider Tumoren.....	11
Abbildung 1.3: Signaltransduktionsweg des ras- und raf-Proteins	20
Abbildung 1.4: Pathomechanismus der pulmonalen Hypertonie	27
Abbildung 2.1: Echokardiographische Verlaufskontrollen in den 3 Tierversuchen.....	58
Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des Herzzyklusses	62
Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des Tumor-Areals und Nicht-Tumor-Areals	79
Abbildung 3.1: Verlaufsdarstellung des Mausgewichts im LLC1-Lungentumormodell	84
Abbildung 3.2: Makroskopische Lungenaufnahme beim LLC1-Lungentumormodell	85
Abbildung 3.3: Graphische Verlaufsdarstellung der echokardiographisch erhobenen Parameter des Lewis Lung Carcinoma 1-Lungentumormodells	86
Abbildung 3.4: Graphische Darstellung der Drücke beim LLC1-Lungentumormodell	89
Abbildung 3.5: Graphische Darstellung der Parameter der Rechtsherzhypertrophie und des Hämatokrits beim LLC1-Lungentumormodell.....	90
Abbildung 3.6: Graphische Darstellung der Blutgase beim LLC1-Lungentumormodell.....	91
Abbildung 3.7: Histologische Übersichtsaufnahme eines repräsentativen Lungenschnitts des LLC1-Lungentumormodells	92
Abbildung 3.8: Färbung und Graphen zur Darstellung der mittleren Wandstärke von Pulmonal- gefäßen im LLC1-Lungentumormodell.....	93
Abbildung 3.9: Färbung und Graphen zur Darstellung des Muskularisierungsgrads von Pulmonal- gefäßen im LLC1-Lungentumormodell.....	94
Abbildung 3.10: Färbung und Graphen zur Darstellung des prozentualen Kollagengehalts des rechten Ventrikels im LLC1-Lungentumormodell	96
Abbildung 3.11: Verlaufsdarstellung des Mausgewichts im K-ras ^{LA2} -Lungentumormodell.....	97
Abbildung 3.12: Makroskopische Lungenaufnahme des K-ras ^{LA2} -Lungentumormodells	98
Abbildung 3.13: Graphische Verlaufsdarstellung der echokardiographisch erhobenen Parameter des K-ras ^{LA2} -Lungentumormodells	98
Abbildung 3.14: Graphische Darstellung der Drücke beim K-ras ^{LA2} -Lungentumormodell.....	101
Abbildung 3.15: Graphische Darstellung der Parameter der Rechtsherzhypertrophie und des Hämatokrits beim K-ras ^{LA2} -Lungentumormodell	102
Abbildung 3.16: Graphische Darstellung der Blutgase beim K-ras ^{LA2} -Lungentumormodell	103
Abbildung 3.17: Histologische Übersichtsaufnahme eines repräsentativen Lungenschnitts des K-ras ^{LA2} -Lungentumormodells	104
Abbildung 3.18: Färbung und Graphen zur Darstellung der mittleren Wandstärke von Pulmonal- gefäßen im K-ras ^{LA2} -Lungentumormodell	104

Abbildung 3.19: Färbung und Graphen zur Darstellung des Muskularisierungsgrads von Pulmonalgefäßen im K-ras ^{LA2} -Lungentumormodell	106
Abbildung 3.20: Färbung und Graphen zur Darstellung des prozentualen Kollagengehalts des rechten Ventrikels im K-ras ^{LA2} -Lungentumormodell	108
Abbildung 3.21: Verlauf des Mausgewichts im SP-C-c-raf-1-BxB-23-Lungentumormodell.....	109
Abbildung 3.22: Lungenaufnahme des SP-C-c-raf-1-BxB-23-Lungentumormodells	110
Abbildung 3.23: Graphische Verlaufsdarstellung der echokardiographisch erhobenen Parameter des SP-C-c-raf-1-BxB-23-Lungentumormodells	111
Abbildung 3.24: Graphische Darstellung der Drücke beim SP-C-c-raf-1-BxB-23-Lungentumormodell.....	114
Abbildung 3.25: Graphische Darstellung der Parameter der Rechtsherzhypertrophie und des Hämatokrits beim SP-C-c-raf-1-BxB-23-Lungentumormodell	115
Abbildung 3.26: Graphische Darstellung der Blutgase beim SP-C-c-raf-1-BxB-23-Lungen-tumormodell.....	116
Abbildung 3.27: Histologische Übersichtsaufnahme eines repräsentativen Lungenschnitts des SP-C-c-raf-1-BxB-23-Lungentumormodells	117
Abbildung 3.28: Färbung und Graphen zur Darstellung der mittleren Wandstärke von Pulmonal-gefäßen im SP-C-c-raf-1-BxB-23-Lungentumormodell	118
Abbildung 3.29: Färbung und Graphen zur Darstellung des Muskularisierungsgrads von Pulmonalgefäßen im SP-C-c-raf-1-BxB-23-Lungentumormodell	119
Abbildung 3.30: Färbung und Graphen zur Darstellung des prozentualen Kollagengehalts des rechten Ventrikels im SP-C-c-raf-1-BxB-23-Lungentumormodell	121
Abbildung 3.31: Histologische Übersichtsaufnahme eines repräsentativen Lungenschnitts eines humanen Plattenepithelkarzinoms	122
Abbildung 3.32: Serienschnitte eines umgebauten pulmonalen Gefäßes eines humanen Adeno-karzinoms mit Neointima	122
Abbildung 3.33: Plexiforme Läsionen im Tumor-Areal humaner Adenokarzinome	123
Abbildung 3.34: Färbung und Graphen zur Darstellung der mittleren Wandstärke von Pulmonalgefäßen in Plattenepithel- und Adenokarzinomen	123
Abbildung 3.35: Färbung und Graphen zur Darstellung des Muskularisierungsgrads von Pulmonalgefäßen in Plattenepithel- und Adenokarzinomen	125
Abbildung 3.36: Färbung und Graphen zur Darstellung des T-Lymphozyten-Gehalts in den Wänden der pulmonalen Gefäße in humanen Plattenepithel- und Adenokarzinomen.....	128
Abbildung 3.37: Färbung zur Darstellung des T-Lymphozyten-Gehalts in den Wänden der pulmonalen Gefäße im LLC1- und K-ras ^{LA2} -Lungentumormodell	130
Abbildung 3.38: Färbung und Graphen zur Darstellung des Makrophagen-Gehalts in den Wänden der pulmonalen Gefäße in humanen Plattenepithel- und Adenokarzinomen	131
Abbildung 3.39: Färbung und Graphen zur Darstellung des Gehalts an dendritischen Zellen in den Wänden der pulmonalen Gefäße in humanen Plattenepithel- und Adenokarzinomen.....	133

Abkürzungsverzeichnis

<i>Aqua dest.</i>	<i>Aqua destillata</i> , destilliertes Wasser
<i>A. carotis communis</i>	<i>Arteria carotis communis</i> , gemeinsame Halsschlagader
<i>A. pulmonalis</i>	<i>Arteria pulmonalis</i> , Pulmonalarterie
Abb.	Abbildung
ALK1	Activin-receptor-like-Kinase 1
ANOVA	Analysis of variance, Varianzanalyse
ATS	American Thoracic Society
bFGF	Basischer Fibroblastenwachstumsfaktor
B-Lymphozyten	Im Knochenmark geprägte Lymphozyten
BMPR2	Bone-morphogenetic-protein-Rezeptor-2
BSA	Bovines Serumalbumin
BW	Körpergewicht
bzw.	beziehungsweise
Ca ²⁺	Kalzium-Ion
CCL	Chemokin Ligand
CD	Immunphänotypische Oberflächenmerkmale
CO	Herzminutenvolumen
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTEPH	Chronische thrombembolische pulmonale Hypertonie
CXCL	CXC-Motiv-Ligand
CXCR	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
erbB2	Erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
ERS	European Respiratory Society
ET-1	Endothelin-1
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> , und andere

FCS	Fetales Kälberserum
GM-CSF	Granulozyten Monozyten Kolonie stimulierender Faktor
HIF-1	Hypoxie-induzierter Faktor-1
IASLC	International Association for the Study of Lung Cancer
Ig	Immunglobulin
IGF-1	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor-1
IL	Interleukin
IFN- α	α -Interferon
i.p.	intraperitoneal
IPAH	Idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie
i.v.	intravenös
K ⁺	Kalium-Ion
LLC	Lewis Lung Carcinoma
LNN.	Lymphknoten
LV+S	Linker Ventrikel plus Septum
MAPK	ras-Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MHC	Hauptkompatibilitätskomplex
MMP	Matrix-Metalloproteasen
myc	Myelocytomatosis oncogene
n	Anzahl
n. Chr.	Nach Christus
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
O ₂	Sauerstoff
P _a	Artrieller Partialdruck von
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDGF	Blutplättchen-Wachstumsfaktor
PGI ₂	Prostaglandin I ₂
pH	<i>potentia hydrogenii</i> , negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
P _v	Venöser Partialdruck von

raf	Rat fibrosarcoma oder rapidly accelerated fibrosarcoma
ras	Rat sarcoma
rb1	Retinoblastom-Protein
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640-Medium
IVRT/RR	Isovolumetrische Relaxationszeit
RV MPI	Myokardialer Leistungsindex des rechten Ventrikels
RV	Rechter Ventrikel
RVID	Innerer Durchmesser des rechten Ventrikels
RVSP	Rechtsventrikulärer systolischer Blutdruck
SAP	Systemisch arterieller Blutdruck
SP-C	Surfactant Protein-C
SU5416	Sugen 5416
Tab.	Tabelle
TAPSE	Systolische Bewegung des Trikuspidalanulus
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor- β
T-Lymphozyten	Im Thymus geprägte Lymphozyten
TNF	Tumornekrosefaktor
TP53	Tumor Protein 53
UpM	Umdrehungen pro Minute
<i>V. jugularis externa</i>	<i>Vena jugularis externa</i> , äußere Jugularvene
<i>V. cava inferior</i>	<i>Vena cava inferior</i> , untere Hohlvene
v.a.	vor allem
VCAM-1	Vaskuläres Adhäsionsmolekül-1
v.Chr.	vor Christus
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid
vs.	<i>versus</i>
vWf	von Willebrand-Faktor
WHO	Weltgesundheitsorganisation
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1 Einleitung

1.1 Lungenkrebs

1.1.1 Definitionen

Tumoren oder Neoplasien werden als abnorme Gewebemassen definiert, deren Wachstum dessen normalen Gewebes übersteigt, unkoordiniert verläuft und persistiert, auch wenn der das Wachstum auslösende Stimulus verschwindet (Willis, 1952). Man unterscheidet bei den Tumoren die gutartigen von den bösartigen Geschwülsten. Gutartige oder benigne Tumoren charakterisieren sich durch einen histologischen Aufbau der dem Muttergewebe entspricht. Sie wachsen nicht infiltrativ und metastasieren nicht, im Gegensatz zu den bösartigen oder malignen Tumoren (Gerok *et al.*, 2007).

Für die malignen Tumorerkrankungen wurde der Begriff „Krebs“ durch den griechischen Arzt und Gelehrten Hippokrates geprägt. Ihn erinnerte das kanzeröse Wachstum an einen sich fortbewegenden Krebs. Als „Karkinos“ bezeichnete er nicht heilende Schwellungen, Ulcera oder Hämorrhoiden, wohingegen „Karkinoma“ zur Benennung nicht heilender Umfangsvermehrungen diente (Weiss, 2000). Diese Nomenklatur wurde anschließend vom römischen Arzt Aulus Celsus (25 v.Chr.-50 n.Chr.) übernommen, für den sich Neoplasien wie die Scheren eines Krebses am umliegenden Gewebe festhalten. Gehen die bösartigen Tumoren von Zellen des Lungengewebes aus, spricht man von Lungenkrebs.

1.1.2 Vorkommen

Krebserkrankungen stellen heutzutage, nach Herz-Kreislauserkrankungen sowie infektiösen und parasitären Erkrankungen, die weltweit dritthäufigste Todesursache dar (WHO, 2008). Sie sind jedoch keinesfalls eine moderne Erscheinung. Erste Beweise dafür, dass Neoplasien bei Tieren bereits lange vor dem Erscheinen des Menschen auf unserem Planeten auftraten, lieferten

paläontologische Funde (Hajdu, 2011). Der erste schriftliche medizinische Krebsbefund, eine Neoplasie der Brust, wurde 3000 v.Chr. auf dem Papyrus von Edwin Smith festgehalten (Breasted, 1930).

Laut Weltgesundheitsorganisation rangiert Lungenkrebs bei Männern aller Altersstufen auf Platz 1 der durch Krebs hervorgerufenen Todesfälle, unabhängig von ethnischer Herkunft und Einkommen. Bei den Frauen verursachen maligne Tumoren der Lunge weltweit, nach Brustkrebs, die häufigsten krebsassoziierten Todesfälle vor Magenkrebs (WHO, 2008). Weltweit starben 2008 1,4 Millionen Menschen an Lungenkrebs, was in etwa 18 % aller krebsassoziierten Todesfälle darstellt (Jemal *et al.*, 2011).

Die Inzidenz von Lungenkrebs in den USA ist sowohl bei Männern als auch bei Frauen rückläufig, wobei der leichte Rückgang bei den Frauen erst seit den späten 90er Jahren zu verzeichnen ist, etwa 10 Jahre später als bei den Männern (Howlader *et al.*, 2011). Die Ursache liegt in einem Rückgang des Tabakkonsums über die vergangenen 50 Jahre (Jemal *et al.*, 2008b). In Deutschland hingegen ist die Lungenkrebsrate bei Frauen stets ansteigend (RKI und GEKID, 2012).

Die Prognose ist, mit einer relativen 5-Jahresüberlebensrate von 15 % bei Männern und 19 % bei Frauen, immer noch vorsichtig zu stellen, da die Lungenkrebspatienten meist erst in einem späten Krankheitsstadium vorstellig werden und probate Screening-Methoden fehlen (Jemal *et al.*, 2008a; RKI und GEKID, 2012).

1.1.3 Klassifikation

1.1.3.1 Pathologische Klassifikation

Lungenneoplasien können nach histologischen Kriterien sowohl in benigne Tumoren (v.a. Adenome, aber auch Chondrome, Hamartome, Osteome, Fibrome, Histiozytome, Lipome) als auch in maligne Tumoren unterteilt werden. Jedoch entsprechen nur 2-5 % aller Lungentumoren gutartigen Neoplasien. Den Großteil beanspruchen maligne Primärtumoren der Lunge, gefolgt von Metastasen extrapulmonaler Neoplasien (Ott und Geiser, 2012).

Tabelle 1.1: Histologische Klassifikation von Lungenkrebs; nach 2004 WHO Klassifikation und 2011 IASLC/ATS/ERS Klassifikation der Adenokarzinome der Lunge (nach Travis, 2011)

Hauptkategorie	Subtypen	Weitere Untereinteilung
Präinvasive Läsion	Squamöse Dysplasie/In-Situ-Karzinom	
	Atypische adenomatöse Hyperplasie	
	In-Situ-Adenokarzinom	
	Diffuse idiopathische pulmonale Hyperplasie neuroendokriner Zellen	- Nicht muzinös - Muzinös - Gemischt
Plattenepithelkarzinom	Varianten	- Papillär - Klarzellig - Kleinzellig - Basaloid
Kleinzelliges Karzinom	Kombiniertes kleinzelliges Karzinom	
Adenokarzinom	Minimal-invasives Adenokarzinom (≤ 3 cm, prädominant lepidisch mit ≤ 5 mm Invasion)	- Nicht muzinös - Muzinös - Gemischt
	Invasives Adenokarzinom	- Prädominant lepidisch - Prädom. azinär - Prädom. papillär - Prädom. mikropapillär - Prädom. solide mit Muzin
	Varianten invasiver Adenokarzinome	- Invasiv muzinös - Kolloid - Fetal - Enterisch
Großzelliges Karzinom	Varianten	
	Großzelliges, neuroendokrines Karzinom (LNEC)	- Kombiniertes LNEC
	Basaloides Karzinom	
	Lymphepitheliom-ähnliches Karzinom	
	Klarzelliges Karzinom	
	Großzelliges Karzinom mit rhabdoidem Phänotyp	
Adenosquamöses Karzinom		
Sarkomatoides Karzinom	Pleomorphes Karzinom	
	Spindelzell-Karzinom	
	Riesenzell-Karzinom	
	Karziносarkom	
	Pulmonales Blastom	
	Andere	
Karzinoidtumoren	Typisches Karzinoid	
	Atypisches Karzinoid	
Bronchialdrüsenkarzinome vom Speicheldrüsentyp	Mucoepidermoides Karzinom	
	Adenoides zystisches Karzinom	
	Epimyoeitheliales Karzinom	

Die vier häufigsten malignen Tumortypen sind das Plattenepithelkarzinom, das Adenokarzinom, das kleinzellige Karzinom und das großzellige Karzinom, wobei Plattenepithelkarzinom und Adenokarzinom früher als Nicht-kleinzelliges Karzinom oder „non-small-cell lung cancer“ (NSCLC) zusammengefasst wurden.

Adenokarzinome stellen mit 38 % in den USA die meistdiagnostizierte Lungenkrebsart dar. Die Heterogenität dieser Gruppe veranlasste die „International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC)“ sich mit der „American Thoracic Society (ATS)“ und der „European Respiratory Society (ERS)“ zusammenzuschließen, um eine Klassifikation dieser Karzinome mit drüsiger Differenzierung zu entwickeln. Die Abbildung 1.1 zeigt die Unterscheidung des invasiven Adenokarzinoms in prädominant lepidische, papilläre, azinäre, solide oder mikropapilläre Subtypen, wobei das prädominant azinäre Wachstumsmuster laut diverser retrospektiver Studien mit etwa 50 % am häufigsten vertreten ist (Sica *et al.*, 2010; Travis *et al.*, 2011; Yoshizawa *et al.*, 2011).

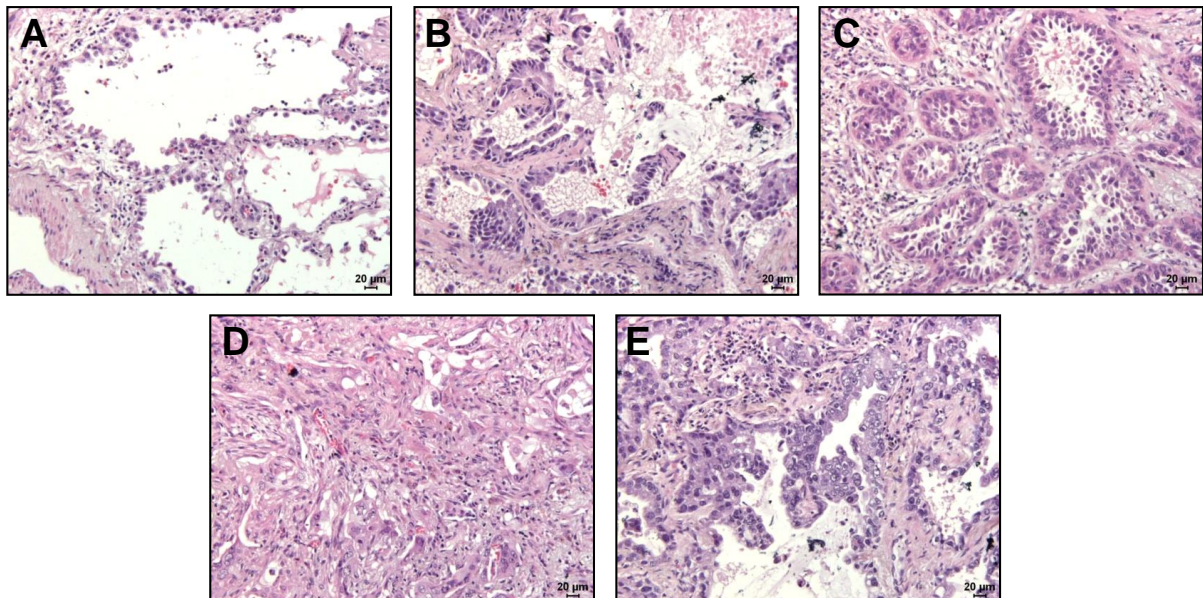


Abbildung 1.1: Wachstumsmuster invasiver Adenokarzinome

(A) Prädominant lepidisch. (B) Prädominant papillär. (C) Prädominant azinär. (D) Prädominant solide. (E) Prädominant mikropapillär. (Hämatoxylin-Eosin, Originalvergrößerung x200).

Wie aus Abb. 1.1 ersichtlich, wachsen beim lepidischen Wachstumsmuster die atypischen Pneumozyten ohne Invasion an den leicht verdichteten alveolären Septa entlang. Der papilläre Subtyp ist gekennzeichnet durch das Wachstum kuboidaler Zellen entlang der Oberfläche einer fibrovaskulären Achse. Beim häufigsten azinären Subtyp stechen die runden bis ovalen Drüsen aus atypischen Epithelzellen hervor, wobei der solide Subtypus aus dichten Tumorzelltrabekeln aufgebaut ist. Beim mikropapillären Wachstumsmuster wachsen Drüsenzellen ähnlich dem papillären Subtypen in kleinen Büscheln, aber ohne fibrovaskuläre Stromaachse (Yoshizawa *et al.*, 2011).

In den USA stellt das Plattenepithelkarzinom die histopathologische Diagnose bei 20 % aller Lungenkrebspatienten dar, mit deutlich zu verzeichnendem Anstieg während der letzten Jahre. Es leitet sich aus bronchialen Schleimhautdysplasien mit zellulären Atypien, dem sogenannten In-Situ-Karzinom, ab und zeigt unterschiedliche Differenzierungsgrade. Diese variieren von hoch differenziert, mit Ausbildung von Interzellularbrücken und Verhornung, bis zur kompletten Anaplasie mit Formation von Nekrosen und Kavernen (Travis, 2011).

Das kleinzellige Karzinom kommt in 14 % aller malignen Lungentumoren vor. Die runden bis fusiformen, 5-8 µm kleinen Tumorzellen liegen peribronchial und zeigen eine Tendenz zur Metastasierung in die regionären Lymphknoten, Nekrosebildung und Infiltration. Oft werden paraneoplastische Syndrome beobachtet, wie z.B. durch ektope Produktion des adrenocorticotropen Hormons (ACTH) ausgelöster Morbus Cushing (Böcker *et al.*, 2004; Travis, 2011).

Großzellige Karzinome stellen eine Ausschlussdiagnose dar, repräsentieren aber immerhin 3 % aller Lungenkarzinome (Altekruse *et al.*, 2010). Meist in der Peripherie gelegen, sind sie aus Nekrosen und Nestern großer, polygonaler Zellen mit prominentem, vesikulären Nukleolus aufgebaut (Travis, 2011).

1.1.3.2 TNM-Klassifikation

Tabelle 1.2: 7. Edition der TNM-Klassifikation des American Joint Committee on Cancer

Beschreibung	Deskriptor	Stadium			
		N0	N1	N2	N3
Tumor ≤ 2 cm	T1a	IA	IIA	IIIA	IIIB
Tumor > 2 cm, aber ≤ 3 cm	T1b	IA	IIA	IIIA	IIIB
Tumor > 3 cm, aber ≤ 5 cm	T2a	IB	IIB	IIIA	IIIB
Tumor > 5 cm, aber ≤ 7 cm	T2b	IB	IIB	IIIA	IIIB
Tumor > 7 cm	T3	IB	IIB	IIIA	IIIB
Invasion von Thoraxwand, Zwerchfell, <i>Pleura parietalis</i> oder Perikard; oder > 2 cm von der <i>Bifurcatio tracheae</i> entfernt; oder Atelektase eines Lungenflügels; oder Satelliten-Knoten in demselben Lobus	T3	IIB	IIIA	IIIA	IIIB
Zusätzliche Knoten in demselben Lobus	T3	IIIB	IIIB	IIIB	IIIB
Invasion von Mediastinum, Herz, großen Gefäßen, Luft- oder Speiseröhre, Wirbelkörper, <i>Bifurcatio tracheae</i> ; oder Satelliten-Knoten in dem selben Lungenflügel	T4	IIIB	IIIB	IIIB	IIIB
Zusätzliche Knoten in anderem Lobus	T4	IV	IV	IV	IV
Pleurale Dissemination	M1a	IIIB	IIIB	IIIB	IIIB
Ein oder mehrere Knoten im kontralateralen Lobus; oder pleurale Knoten; oder perikardiale Effusion	M1a	IV	IV	IV	IV
Fernmetastasen	M1b	IV	IV	IV	IV

(**T**) Tumor. (**M**) Metastase. (**N0**) Keine Lymphknoten(LNN)-Metastasen. (**N1**) Ipsilaterale peri-bronchiale und/oder hiläre intrapulmonale LNN-Metastasen. (**N2**) Ipsilaterale mediastinale und/oder subkarinale LNN-Metastasen. (**N3**) Kontralaterale LNN-Metastasen, sowie ipsi- oder kontralaterale Metastasen in Skalenus- oder Supraklavikular-LNN (nach Riede et al., 2009; Rodriguez, 2012).

Der Krankheitsverlauf wird, neben dem eigentlichen Primärtumor, v.a. durch das Vorhandensein von Metastasen beeinflusst. Die durch Metastasen verschlechterte Prognose war bereits 1946 für Pierre Denoix der Auslöser zur Entwicklung eines Klassifizierungssystems, das die Ausdehnung des Primärtumors (T), das Vorhandensein und die Ausdehnung veränderter regionärer Lymphknoten (N), sowie die Präsenz von Fernmetastasen (M) erfasst (Denoix, 1946). Die aktuelle Überarbeitung dieser Klassifikation von 2009 gilt als allgemeine Basis zur Feststellung der Tumorstadien (IA bis IV) und Grundlage für die Therapie (Sobin *et al.*, 2009).

Neben T, N und M gelten weitere Prognosefaktoren in der Onkologie als therapie-relevant. Dazu gehören die Invasion von Tumorzellen in Lymphgefäße (L), deren Eindringen in Venen (V) und der Residualtumorstatus (R). Der R-Status gibt an, ob der Primärtumor nach einer Behandlung persistiert. Er kann sich aber auch auf dessen Lymphabflussgebiet oder Fernmetastasen beziehen. Zudem wird das Grading (G) zur Beurteilung der Differenzierung des Tumorgewebes herangezogen. G1 steht dabei für einen gut differenzierten, dem Ursprungsgewebe ähnlichen Tumor, G4 hingegen als undifferenziert (Jauch *et al.*, 2013).

1.1.4 Pathophysiologie

Im Laufe der vergangenen 50 Jahre konnte anhand diverser Tiermodelle v.a. an der murinen Haut aufgeklärt werden, dass Neoplasien aus einer Anhäufung genetischer und epigenetischer Veränderungen resultieren, die über einen jahre- bis jahrzehntelangen Zeitraum entstehen. Die sogenannte Mehrstufenkarzinogenese mit Tumorinitiation, Promotion und Progression dient als Modell der Krebsentstehung (Seije und Bernstein, 1980; DeVita *et al.*, 1997).

1.1.4.1 Initiation

Im Rahmen der monoklonalen Entwicklungstheorie wirken bei diesem ersten Schritt der Karzinogenese chemische oder physikalische Karzinogene, sogenannte Initiatoren, auf eine Ausgangszelle ein, um einen DNA-Schaden, wie DNA-Alkylierungen und DNA-Fehlpaarungen, sowie fehlerhafte DNA-Reparatur zu verursachen. Ohne Schadensbehebung in den nachfolgenden 1-2 Replikationen durch Reparaturmechanismen wird der Schaden in Form einer Mutation im Genom der Zelle verfestigt. Diese transformierten Zellen können mit solch einer Mutation unauffällig über Jahre persistieren (McGavin und Zachary, 2009). Betroffen von diesen DNA-Schäden sind v.a. Onkogene und Tumorsuppressorgene (Böcker *et al.*, 2004).

Die bei Lungenkrebs bedeutendsten chemischen Kanzerogene befinden sich im Tabakrauch. So entfaltet der polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoff

3,4-Benzpyren unmittelbar nach Inhalation und Aktivierung durch Zytochrom P450-Enzyme seine mutagene Wirkung am Bronchialepithel (U.S.-Public-Health-Service, 1972; Böcker *et al.*, 2004). Ebenso konnte für andere Emissionen, wie die von Dieselmotoren, und für anorganische Substanzen, wie Asbest, Arsen- und Chromverbindungen, eine kausale Beziehung zu Lungenkarzinomen nachgewiesen werden (Doll, 1955; Böcker *et al.*, 2004; Pintos *et al.*, 2012; RKI und GEKID, 2012). Physikalische Noxen wie ionisierende Strahlung, zu welcher kurzwellige ultraviolette Strahlung, Röntgenstrahlen, sowie α -, β - und γ -Strahlen gehören, entfalten ihre initiierende Wirkung, indem sie intrazellulär reaktive Sauerstoffspezies generieren, die mit der DNA interagieren (Kauffmann *et al.*, 1998).

Prädisponierend wirken dabei genetische Faktoren, aufgrund der Tatsache, dass spezifische Phänotypen eine besonders hohe Krebsinzidenz zeigen. So konnte für das Zytochrom CYP1A1, welches bei der Aktivierung von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen impliziert ist, ein erhöhtes Lungenkrebsrisiko bei dem Allel CYP1A1 MspI nachgewiesen werden (Wu *et al.*, 2004).

Infektiöse Agentien stellen weitere initiierende Noxen dar. DNA-Viren beispielsweise, wie das humane Papillomavirus-16 und Merkel-Zell-Polyomaviren, werden mit dem Auftreten von Lungenneoplasien in Zusammenhang gebracht (Aguayo *et al.*, 2007; Joh *et al.*, 2010; Gheit *et al.*, 2012). Vorangehende pulmonale Erkrankungen, wie Emphysem, chronische Bronchitis, Pneumonie und Tuberkulose gehen ebenfalls mit einer erhöhten Lungenkrebsinzidenz einher (Brenner *et al.*, 2012).

1.1.4.2 Promotion

Die Tumorpromotion umfasst das klonale Wachstum der initiierten Zelle. Sogenannte Promotoren, die in der Regel selbst nicht kanzerogen wirken, schaffen durch Veränderung der Genexpression ein Milieu, in dem die Mutation tragende Zelle im Vergleich zu nichtinitiierten Zellen einen Proliferationsvorteil hat (McGavin und Zachary, 2009). Dies betrifft Gene, deren Produkte mit Hyperproliferation, Apoptose, Gewebeumbau und Entzündung assoziiert sind und resultiert in einem reversiblen gutartigen Tumor, Hyperplasie oder Dysplasie (Hursting *et al.*, 1999).

1.1.4.3 Progression

Dieser letzte Schritt der Tumorentstehung beschreibt die Selektion zunehmend bösartiger Subpopulationen an Tumorzellen und die damit verbundene Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung der selektierten Zellen. Voraussetzung für die Entwicklung von Subklonen ist die zunehmende Ansammlung genetischer Veränderungen, sowie die Erlangung genetischer Instabilität. Die Fähigkeit der mutierten Zellen der Apoptose zu entkommen, DNA nicht korrekt zu reparieren und Telomerase zu aktivieren, ermöglicht es ihnen lange instabile Telomere zu bilden, die eine Tendenz zu Strangbrüchen und anderen genetischen Aberrationen zeigen (McGavin und Zachary, 2009).

Im Rahmen der Mehrschritt-Theorie der Karzinogenese treten genetische Veränderungen sowohl in der Phase der Initiation als auch in der Progression auf. Da Menschen stets einer Vielzahl von schädlichen Agenzien ausgesetzt sind, die simultan an unterschiedlichen Stadien der Kanzerogenese wirken, ist es unmöglich die auftretenden Mutationen klar einer Stufe zuzuordnen. Die wichtigsten Gensysteme, die von diesen Schäden betroffen sind, umfassen die Onko-, Tumorsuppressor-, Apoptose-, Telomerase- und DNA-Reparaturgene.

Onkogene entstammen, nach Mutation oder Amplifikation, physiologisch vorkommenden zellulären Protoonkogenen, die Zellwachstum und –differenzierung steuern (McGavin und Zachary, 2009). Im Bronchialkarzinom tragen z.B. die Überexpression des Tyrosinkinase-Rezeptors erbB2, die konstitutive Aktivität des ras-Proteins und die Überexpression des myc-Transkriptionsfaktors zur Steigerung der Proliferation und Hemmung der terminalen Differenzierung bei (Böcker *et al.*, 2004; Dietel *et al.*, 2005).

Bei den Tumorsuppressorgenen handelt es sich um Gene die u.a. Zellzyklus, Apoptose und DNA-Reparatur regulieren und die, nach ihrer Inaktivierung durch genetische und epigenetische Mechanismen oder Verlust beider Allele, zu Zellproliferation führen (McGavin und Zachary, 2009). Mutationen des nukleären Phosphorproteins rb1 und des „Hüters des Genoms“ TP53 konnten beim Bronchialkarzinom nachgewiesen werden (Böcker *et al.*, 2004).

1.1.4.4 Invasion und Metastasierung

Ziel der Metastasierung ist die Verschleppung von Tumorzellen vom Primärtumor, über Lymph- und Blutgefäße oder durch kavitäre Ausbreitung, an einen anderen Ort mit Bildung einer Tochtergeschwulst.

Beim ersten Schritt, dem Verlust der Adhäsion, werden zunächst Adhäsionsmoleküle der Tumorzellen, wie Cadherine oder Catenine abgebaut oder derart verändert, dass Zellen sich vom Haupttumor lösen. Spezifische Rezeptoren, wie Integrine und Hyaluronsäurerezeptor CD44, ermöglichen es ihnen anschließend Kontakt mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix aufzunehmen (Savagner, 2001; McGavin und Zachary, 2009; Shih und Yang, 2011).

Bei der sich anschließenden Invasion bauen die bösartig entarteten Zellen die Basalmembran und Bestandteile der extrazellulären Matrix ab, indem die Tumorzellen selbst oder von ihnen angeregte Stromazellen eine Vielzahl von Proteasen (u.a. Matrix-Metalloproteinasen MMPs, Serin- und Cysteinprotease, Heparanasen, Hyaluronidasen und Proteoglykanasen), aber auch Antiproteinasen, wie die „Tissue Inhibitors of Metalloproteinase 1 und 2“ bilden (Zucker *et al.*, 2000; Liotta und Kohn, 2001; Böcker *et al.*, 2004).

Chemoattraktive Substanzen, autokrine Faktoren, sowie Spaltprodukte der extrazellulären Matrix steigern die Motilität der Krebszellen in Richtung Gefäßlumen (McGavin und Zachary, 2009). Die Zellen vollziehen dabei einen Wechsel vom epithelialen zum mesenchymalen Phänotypen, die sogenannte epithelio-mesenchymale Transition (EMT). Der Verlust der E-Catherin-Expression und die erhöhte Aktivierung von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, sowie eine Aktivierung des ras-Mitogen aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Signaltransduktionsweges stellen unter anderem wichtige Charakteristika für EMT dar (Dasari *et al.*, 2006). Das Eindringen der Tumorzellen in das Blut- oder Lymphgefäß, auch Intravasation genannt, sowie die Extravasation mit anschließender Infiltration entfernter Gewebe erfolgen nach dem gleichen Prinzip wie die Invasion.

Während des Transports der Tumorzellen in den Blutgefäßen bilden diese sogenannte Tumorzellemboli. Dabei aggregieren die Tumorzellen und umgeben sich mit Fibrin und Thrombozyten, um der tumoriziden Wirkung des Blutes zu

entgehen und sich an das Gefäßendothel anheften zu können. Am Zielort angekommen erfolgt die mesenchymo-epitheliale Transition zum Zwecke der Reorganisation des Epithelgewebes (Riede *et al.*, 2009; Shih und Yang, 2011).

1.1.5 Tumorstroma

Die Zellen des Tumorstromas stehen im Verdacht auf komplexe Weise mit den Tumorzellen zu interagieren und zur Tumorprogression beizutragen. Entsprechend der vor mehr als einem Jahrhundert formulierten „seed and soil“-Hypothese von Paget, kann sich nämlich der Samen (Tumorzelle) nur dort entwickeln, wo er auf einen fertilen Untergrund (Tumorumgebung) trifft (Paget, 1889; Redente *et al.*, 2007).

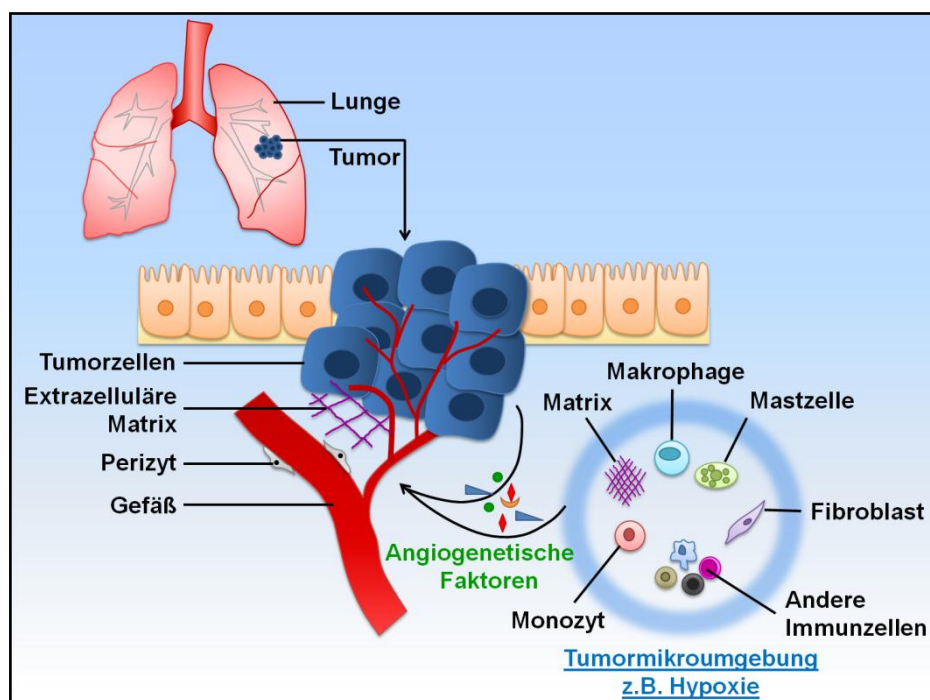


Abbildung 1.2: Der zelluläre Aufbau solider Tumoren

Er ist charakterisiert durch komplexe Interaktionen zwischen Tumorzellen und dem Tumorstroma. Die Zellen des Tumorstromas (z.B. Tumor-assoziierte Fibroblasten, Makrophagen, Mastzellen, Monozyten, T-Lymphozyten und weitere Immunzellen), die extrazelluläre Matrix und die Tumormikroumgebung (z.B. Hypoxie) tragen zur Angiogenese bei. Dies erfolgt durch Sekretion erhöhter Spiegel an angiogenetischen Faktoren (nach Nguewa *et al.*, 2011).

1.1.5.1 Angiogenese

Das autonome Wachstum von Tumorzellen wird begleitet von einer durch den Tumor und dem Tumorstroma induzierten Gefäßneubildung, der Angiogenese. Ab einer Tumorgröße von 1-2 mm ist die eigene Gefäßversorgung unabdingbar, wohingegen bei kleineren Tumoren die Versorgung per Diffusion aus der Umgebung gewährleistet werden kann (Mueller und Fusenig, 2004). Überschreitet der Tumor diese kritische Größe, durchläuft er Hypoxiephasen, bei denen Faktoren wie der Hypoxie-induzierte Faktor-1 (HIF-1) generiert werden, die wiederum angiogenetische Faktoren in der Tumorzelle produzieren (Riede *et al.*, 2009). Zu diesen Faktoren gehören u.a. der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor VEGF und der basische Fibroblastenwachstumsfaktor bFGF, die an Rezeptoren von Gefäßzellen im Stroma binden und eine erhöhte Gefäßpermeabilität, endotheliale Proliferation, Migration und Invasion verursachen (Liotta und Kohn, 2001). VEGF wird sowohl durch Tumorzellen als auch von Fibroblasten, nach Einwirkung von Wachstumsfaktoren, und von Entzündungszellen aus dem Tumorstroma gebildet und wird für diesen „angiogenen Wechsel“ verantwortlich gemacht (De Wever und Mareel, 2003; Li *et al.*, 2007). Durch die vaskuläre Mikropermeabilität treten Plasmaproteine, wie Fibrin aus den Gefäßen aus, was zu einer zusätzlichen Rekrutierung von Fibroblasten, Immunzellen und Endothelzellen führt (Kalluri und Zeisberg, 2006). Neben weiteren Stimulatoren, wie saurem FGF, dem transformierenden Wachstumsfaktor- β (TGF- β) und dem Tumornekrosefaktor (TNF) aus Makrophagen, finden ebenfalls Angiogenese-Inhibitoren ihre Bedeutung bei der Neovaskularisation (Woodhouse *et al.*, 1997; Böcker *et al.*, 2004). Hemmend auf die Gefäßbildung wirken u.a. Angiostatin, α -Interferon (IFN- α), β -Thrombospondin und Heparanase (Woodhouse *et al.*, 1997; Böcker *et al.*, 2004). Nur ein reguliertes Gleichgewicht zwischen diesen Faktoren ermöglicht die Neubildung von Gefäßen auf unterschiedlichen Wegen: Knospung des bereits existierenden Blutgefäßsystems, Rekrutierung vaskulärer Vorläuferzellen zur Bildung neuer Gefäßkanäle oder „vaskuläres Mimikri“, gekennzeichnet durch die Bildung von vaskulären Seitenästen aus Tumorzell-Kanälen (Ribatti *et al.*, 2003).

Das Resultat sind ungleichförmige, weitleumige, stärker gewundene, permeable und oft blind endende Blutgefäße. Zudem weisen die neugebildeten Gefäße nicht die physiologische Hierarchie mit Venolen, Arteriolen und Kapillaren auf, sondern bilden ebenso arteriovenöse Shunts aus (Li *et al.*, 2007).

1.1.5.2 Entzündungszellen

Entzündungsprozesse der Lunge, wie z.B. bei Silikose oder bei durch Nitrosamine und Peroxide im Zigarettenrauch induzierte Bronchitis, stehen in einem engen Zusammenhang mit der Lungenkarzinogenese (Brody und Spira, 2006; Smith *et al.*, 2006; Ilstiy und Coussens, 2006). Entzündungszellen sind nämlich in der Lage, durch Sekretion zahlreicher Zytokine, Wachstumsfaktoren und reaktiver Sauerstoffspezies, DNA-Schäden in Epithelzellen zu verursachen, deren Proliferation zu stimulieren, Apoptose vorzubeugen und ihre Gestalt zu verändern (Coussens und Werb, 2002).

1.1.5.2.1 *T-Lymphozyten*

Lymphozyten liegen je nach Tumorgroße in kleinen Anhäufungen oder großen Aggregaten am Tumorrand außerhalb des dichten Tumorparenchyms oder in der Nähe größerer Bronchien, wo sie das Bronchus-assoziierte lymphoide Gewebe (BALT) bilden (Redente *et al.*, 2007).

T-Lymphozyten werden anhand ihrer Oberflächenmoleküle in die Unterscheidungsgruppen CD4⁺ und CD8⁺ unterteilt. CD8⁺ T-zytotoxische Zellen erkennen Hauptkompatibilitätskomplex (MHC)-I-Antigen-Komplexe auf Tumorzellen, was ihnen ermöglicht diese direkt durch Perforine zu lysieren. Gleiches passiert mit Antigen-kreuzpräsentierenden Tumor-assoziierten Makrophagen und Nicht-Knochenmark-Zellen, wie Endothelzellen oder Fibroblasten. Zum anderen führt die Erkennung dieses MHC-I-Antigen-Komplexes zu einer IFN- γ -Produktion, die ihre Wirkung auf Zellen des Tumorstromas, wie beispielsweise Endothelzellen, entfaltet, um die Angiogenese zu verhindern (Kammertoens *et al.*, 2005). Während CD8⁺ zytotoxische T-Lymphozyten die Haupteffektorzellen in den meisten Tumorarten darstellen, sind CD4⁺ T-Zellen

nötig für deren Aktivierung und Überleben. Sie sind aber auch in Abwesenheit von CD8⁺ T-Zellen in der Lage als Effektorzellen zu agieren, indem sie Hypersensitivitätsreaktionen vom verzögerten Typ auslösen (Kammertoens *et al.*, 2005). Zudem vermögen CD4⁺ Th1-Zellen, ähnlich wie CD8⁺-T-Zellen IFN- γ zu sezernieren, nachdem diese Tumorantigene auf MHCII-Molekülen von Stromazellen, evtl. Makrophagen erkannt haben. CD4⁺ Th2-Zellen induzieren ebenfalls Angiostase, indem Stromazellen ihnen spezifische Tumor-Antigene präsentieren und sie zur Produktion von IL-4 anregen, um auf Fibroblasten einzuwirken (Kammertoens *et al.*, 2005). Ein großer Anteil von sich in NSCLC-Gewebe ansammelnden T-Lymphozyten sind CD4⁺ CD25⁺ T-regulatorische Zellen, die unter physiologischen Umständen vor Autoimmunreaktionen schützen (Woo *et al.*, 2002). Sie werden als „professionelle Suppressorzellen“ bezeichnet, unterbinden über Immunsuppression die zytotoxische Wirkung der T-Effektorzellen und fördern auf diese Weise die Tumorprogression (Shevach, 2001; Ohmura *et al.*, 2008).

1.1.5.2.2 Makrophagen

Monozyten gelangen aktiv aus dem Knochenmark in das Tumorgewebe entlang eines ansteigenden Gradienten an von Tumorzellen sezernierten Chemokinen, wie z.B. Monozyten chemotaktisches Protein-1 (Nesbit *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2007; Redente *et al.*, 2007). Im Tumorgewebe differenzieren sie sich zu den Tumor-assoziierten Makrophagen und stellen die dominierende myeloische Zellpopulation des Tumorgebiets dar (Li *et al.*, 2007; Mantovani und Sica, 2010).

Der vorzugsweise zu etwa 70 % im Tumor auftretende M2-Phänotyp wird durch Zytokine wie u.a. Interleukin IL-4, und IL-13, Immunkomplexe oder Liganden des Toll-ähnlichen-Rezeptors „alternativ“ induziert. Diese M2-Makrophagen sind durch die Expression von Arginase und die Freisetzung immunsuppressiver Zytokine, wie anti-inflammatorisches IL-10, Chemokin Liganden CCL17 und CCL22, sowie Angiogenese-fördernden und Matrix-umbauenden Faktoren, wie VEGF, MMP9 und dem plazentalen Wachstumsfaktor charakterisiert. Im Gegensatz dazu können M1-Makrophagen anhand von Markern wie IL-6, IL-12 und CXC-Ligand CXCL-9 und der Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase

identifiziert werden (Fischer *et al.*, 2007; Redente *et al.*, 2007; Stearman *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2010; Mantovani und Sica, 2010; Huang *et al.*, 2011).

Dem M2-Phänotypen werden tumorfördernde Eigenschaften nachgesagt, die die Rekrutierung von T-regulatorischen Zellen, die Invasion neoplastischer Zellen in das umgebende Stroma und den direkten Umbau des Tumorstromas betreffen. Dies stellt eine primäre Voraussetzung zur Angiogenese und Lymphangiogenese dar (Tlsty und Coussens, 2006; Redente *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2011).

Der M1-Phänotyp wird „klassisch“ durch IFN- γ , bakterielle Bestandteile wie Lipopolysaccharide, Granulozyten Monozyten Kolonie stimulierender Faktor GM-CSF und TNF induziert (Redente *et al.*, 2007; Stearman *et al.*, 2008). M1-Makrophagen produzieren Stickstoffmonoxide, welche mit Superoxiden zytotoxische Peroxynitrite bilden und Tumorzellen abtöten können (Redente *et al.*, 2007). Die tumorsupprimierende Wirkung des M1-Phänotyps beruht auf der geförderten Einwanderung von CD8⁺ T-Effektor-Zellen und von natürlichen Killerzellen (Huang *et al.*, 2011). Redente *et al.* postulieren, dass M2-Phänotypen in frühen benignen Tumorerläsionen vorkommen, wobei M1-Makrophagen bei bereits malignen Adenokarzinomen vorliegen (Redente *et al.*, 2007). Zudem wird Hypoxie als einer der potentesten Auslösefaktoren zur Polarisierung von M1 zu M2-Makrophagen mit Hochregulierung von Hypoxie-induzierten Transkriptionsfaktoren betrachtet (Li *et al.*, 2007; Mantovani und Sica, 2010).

Die strikte Einteilung der Makrophagen in M1 und M2 Makrophagen verliert jedoch zunehmend an Bedeutung. Da sich zeigte, dass innerhalb der M2-Gruppe drastische Unterschiede in den biochemischen und physiologischen Eigenschaften zu verzeichnen sind, schlugen Mosser und Edwards vor, diese Klassifikation durch ein plastischeres System zu ersetzen. Die Makrophagen sollen somit anhand ihrer Funktion in 3 Kategorien unterteilt werden: Immunabwehr (früher M1), Wundheilung oder Immunregulation. Dieses System stellt ein Spektrum dar, bei dem alle Übergänge zwischen den 3 Klassen möglich sind (Edwards *et al.*, 2006; Mosser und Edwards, 2008). So repräsentieren Tumor-assoziierte Makrophagen (früher M2), laut dieser Klassifikation, ein Übergangsstadium zwischen regulatorischen und den für die Wundheilung verantwortlichen Makrophagen (Mosser und Edwards, 2008).

1.1.5.2.3 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen stammen aus dem Knochenmark und gehören zu den professionellen Antigen-präsentierenden Zellen. Vorläuferzellen werden in das periphere Blut abgegeben und siedeln sich in nicht-lymphatischen Organen wie der Lunge an, wo sie sich zu unreifen dendritischen Zellen wandeln (Steinman, 1991; Cella *et al.*, 1997). Die große Kompetenz Antigene per Phagozytose und Makropinozytose zu internalisieren und aufzubereiten, zugleich aber auch eine geringe T-Zell-Stimulationsfähigkeit sind für diese unreifen Zellen charakteristisch. Erst entzündliche Zytokine, wie TNF und IL-1, und bakterielle Produkte wie Lipopolysaccharid führen zur Reifung der dendritischen Zellen, gekennzeichnet durch eine verminderte Kapazität zur Antigenaufbereitung, aber einer verstärkten Expression von MHC, co-stimulatorischen Molekülen und Adhäsionsmolekülen (Steinman, 1991; Sallusto *et al.*, 1995; Cella *et al.*, 1997; Savai *et al.*, 2006). Dadurch werden die dendritischen Zellen befähigt, unter der Lenkung von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen, in sekundäres lymphoides Gewebe auszuwandern (Savai *et al.*, 2006). Dort erfolgt die Antigen-Präsentation über MHC-I resp. II-Moleküle zur Aktivierung und Proliferation von naiven CD8⁺ T-zytotoxischen und CD4⁺ T-Helferzellen. Neben MHC exprimieren dendritische Zellen Zytokine, wie z.B. IL-1, TNF und IL-12, Interleukin mit dem sie Th1-Antworten generieren können (Macatonia *et al.*, 1995; Tanaka *et al.*, 2002). Publikationen zeigen, dass gezielte Hemmung von dendritischen Zellen durch Tumorzellen ein Entfliehen vor dem Immunsystem ermöglicht. So scheint VEGF nicht nur eine wichtige Rolle in der Angiogenese zu spielen, sondern auch in der gezielten Hemmung dendritischer Zellen und somit der Aktivierung des erworbenen Immunsystems (Gabrilovich *et al.*, 1999; Dhodapkar *et al.*, 2001).

1.1.6 Therapie

Vor Beginn der Therapie erfolgt die Klassifikation in das korrespondierende Tumorstadium und die grundlegende Differenzierung in kleinzelliges Bronchialkarzinom und NSCLC. Erst daraus ergeben sich für den Kliniker Konsequenzen bezüglich der Therapieplanung und der Prognosestellung für den Patienten.

So werden in mehr als 95 % der kleinzelligen Bronchialkarzinome extrathorakale Metastasen beobachtet, so dass bei den meisten Bronchialkarzinompatienten auf eine lediglich palliativ ausgerichtete Therapie zurückgegriffen wird (Dietel *et al.*, 2005).

Die Therapie des NSCLC beruht meist auf der chirurgischen Resektion des Tumors mit möglicher mediastinaler Lymphknotenentfernung in Kombination mit einer adjuvanten Chemo- oder Radiotherapie, sofern es der Allgemein- und Gesundheitsstatus des Patienten zulassen. Liegt ein fortgeschrittenes Stadium vor, erfolgt die Resektion *en bloc*, d.h. im Ganzen, mit Entfernung der betroffenen Brustwand, bis hin zur kompletten Pneumonektomie in Kombination mit Radiotherapie bzw. intraoperativer Brachytherapie oder gefolgt von multimodaler Therapie aus Chemotherapie und Radiotherapie, Thoraxdrainage und Resektion isolierter Metastasen (Erbar, 2000; Dietel *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2007).

Die Strahlentherapie kann sowohl zu kurativen Zielen, als auch zur Eindämmung des Primärtumors zum Zwecke der Verbesserung der Lebensqualität nicht heilbarer Patienten eingesetzt werden. Bei der Brachytherapie erfolgt die Bestrahlung lokal, mit Platzierung einer Strahlenquelle mittels Katheter, unter fiberbronchoskopischer Sicht.

Chemotherapeutika können entweder neoadjuvant vor einem chirurgischen Eingriff oder adjuvant nach erfolgreicher Resektion angewendet werden. Als Chemotherapie bei Lungenkrebs haben sich diverse Kombinationen aus Zytostatika wie Etoposid, Cisplatin, Carboplatin und Paclitaxel als Gebräuchlichste erwiesen (Dietel *et al.*, 2005).

1.1.7 Lungentumormodelle

Experimente an Mausmodellen lieferten im Laufe der Geschichte nicht nur wichtige Erkenntnisse zur Aufklärung der Mehrstufenkarzinogenese, sondern stellen seit den vergangenen 50 Jahren die Basis der Krebsforschung dar (Seije und Bernstein, 1980). Aus diesem Grund sollen murine Lungentumormodelle auch in dieser Studie ihre Anwendung finden.

1.1.7.1 Lewis Lung Carcinoma 1-Lungentumormodell

Das Lewis Lung Carcinoma 1 (LLC1)-Lungentumormodell resultiert aus der intravenösen Injektion von LLC1-Zellen in die laterale Schwanzvene.

Die Lewis Lung Carcinoma (LLC)-Zelllinie wurde 1951 von Dr. Margaret R. Lewis am Wistar Institut in Philadelphia etabliert, indem Zellen eines spontan aufgetretenen Lungenadenokarzinoms aus einer C57BL/10-Maus isoliert wurden (Mayo, 1972; Storey *et al.*, 2004). Die LLC1-Zelllinie entstand durch die Arbeiten von Bertram und Janik, bei denen LLC-Zellen intramuskulär in eine C57B1-Maus implantiert wurden, die Lungen nach 10 Tagen entfernt wurden und, nach Anzucht der Tumorzellen, die am schnellsten wachsenden Subklone ausselektiert wurden (Bertram und Janik, 1980). Lose angeheftet oder schwimmend zeigen sie einen runden Phänotypen mit einer Größe von ca. 16 µm und sind gekennzeichnet durch eine geringe Motilität und eine Verdopplungsgeschwindigkeit von 21 Stunden in RPMI 1640-Medium mit 2 % fetalem Kälberserum (FCS) (Bertram und Janik, 1980; ATCC, 2012).

Das Modell der intravenösen Applikation von LLC1-Zellen in die laterale Schwanzvene von Mäusen wurde ebenfalls von Bertram und Janik beschrieben und stellt heute ein weit verbreitetes, gut etabliertes Lungenkrebsmodell zur Erforschung der Metastasenbildung dar (Bertram und Janik, 1980; Henneke *et al.*, 2010). Basierend auf dem Phänomen des gewebespezifischen Tumorzell-„Homing“s bei der Entwicklung von Metastasen, konnte gezeigt werden, dass durch intravenöse LLC1-Injektion in 100 % der Fälle Lungentumoren induziert werden und diese histologisch nicht von den ursprünglichen LLC-Tumoren zu

unterscheiden sind (Bertram und Janik, 1980; Storey *et al.*, 2004). In C57BL/6-Mäusen sind die LLC1-Zellen haploidentisch (H-2^b) und histokompatibel, was die Möglichkeit von kreuzreaktiven Immunantworten minimiert (Storey *et al.*, 2004). Werden 1 Million LLC1-Zellen intravenös in die laterale Schwanzvene injiziert, so entwickeln sich innerhalb von 18 Tagen Metastasen in der Lunge und in der Leber (Chang *et al.*, 2006).

1.1.7.2 K-ras^{LA2}-Lungentumormodell

In etwa 30 % aller humanen Tumoren können ras-Mutationen festgestellt werden (Bos, 1989; Khosravi-Far und Der, 1994). Von den drei Genen der Familie, K-ras, N-ras und H-ras, treten in humanen Tumoren am häufigsten Mutationen im K-ras-Gen auf, z.B. bei Adenokarzinomen in Pankreas, Kolon und Lunge (in 25-50 %) (Johnson *et al.*, 2001).

K-, N- und H-ras gehören zu der Superfamilie der Guaninnukleotid-bindenden Proteine und sind in der Lage zwischen der aktiven Guanosintriphosphat (GTP)-gebundenen Konformation und der inaktiven Guanosindiphosphat (GDP)-gebundenen Form zu wechseln (Janssen *et al.*, 2005). Ras-Proteine sind an der zytosolischen Seite der Plasmamembran lokalisiert und werden durch, an Rezeptor-Tyrosinkinasen bindende Wachstumsfaktoren, Integrine oder Zytokine wie IL-2 aktiviert, wobei GDP durch GTP ausgetauscht wird (Janssen *et al.*, 2005). Nach Ausbleiben weiterer Wachstumsstimuli spaltet die intrinsische GTPase-Aktivität des G-Proteins GTP zu GDP, um das ras-Protein zu deaktivieren. Mutationen von ras führen jedoch zu einer reduzierten intrinsischen GTPase-Aktivität oder verhindern die Herunterregulierung der ras-Aktivität durch das GTPase-aktivierende Protein GAP (Trahey und McCormick, 1987). Somit bleibt das ras-Protein in seiner aktiven GTP-gebundenen Form blockiert und führt über diverse Effektoren zu einer vermehrten Zellproliferation und verminderten Apoptose. Wie in Abbildung 1.3 ersichtlich, gehören zu den nachgeschalteten Effektoren u.a. die Mitogen-aktivierte Proteinkinase und die Phosphoinositid-3-Kinase (Khosravi-Far *et al.*, 1998; McCormick, 1999).

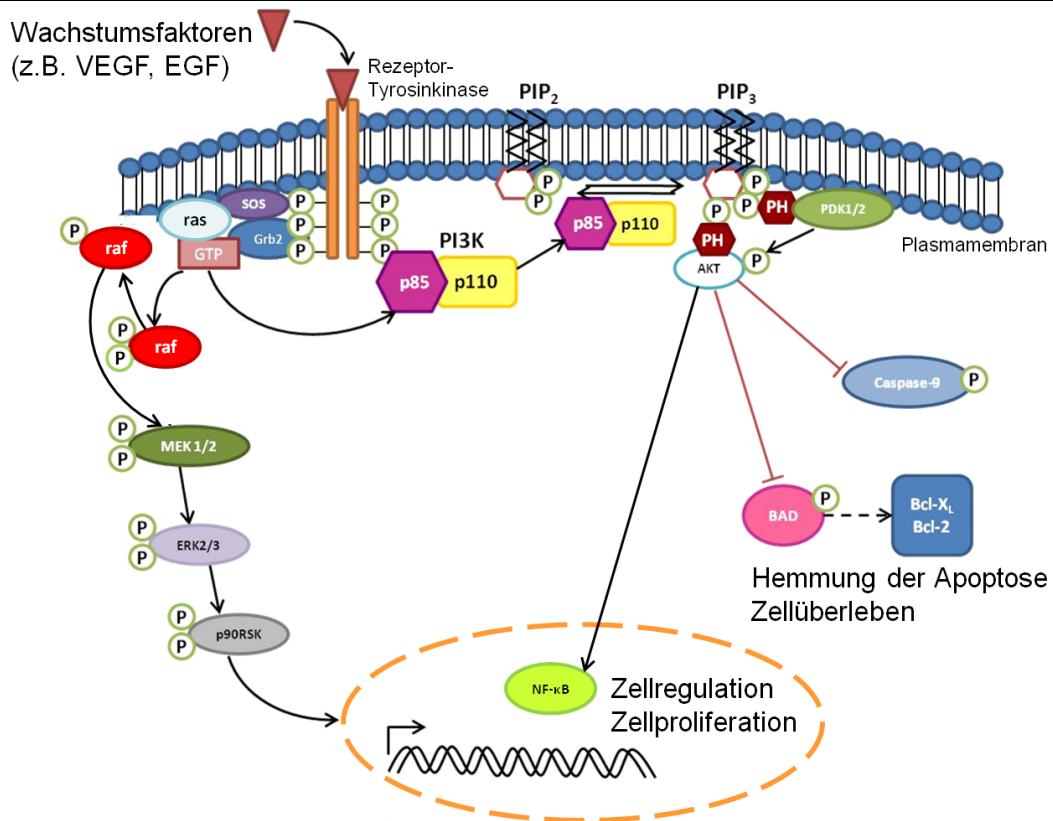


Abbildung 1.3: Signaltransduktionsweg des ras- und raf-Proteins

Die Bindung von Wachstumsfaktoren an Rezeptor-Tyrosinkinasen führt nach Dimerisierung und Autophosphorylierung des Rezeptors u.a. zu einer Rekrutierung des zytosolischen Adapterproteins Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2), welches mit dem SOS (Son of Sevenless) assoziiert ist, an die Plasmamembran. SOS aktiviert daraufhin ras (Rat sarcoma), indem GDP (Guanosindiphosphat) freigesetzt und durch GTP (Guanosintriphosphat) ausgetauscht wird. Ras-GTP bindet dann die Effektorkinase raf (Rat fibrosarcoma) und bewirkt dessen Membranrekrutierung und Konformationsänderung. Kaskadenartige Phosphorylierungen führen dann zur Aktivierung der Serin-Threonin-Kinasen MEK (Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase), ERK (Extracellular-signal regulated kinase) und p90RSK (p90 ribosomale S6 Kinase), welches in den Zellkern gelangt und Transkriptionsfaktoren, wie NF-κB (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) phosphoryliert und aktiviert. Die Bindung von Wachstumsfaktoren und die Aktivierung von ras bewirken zudem, dass PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase) mit der regulatorischen Untereinheit p85 und der katalytischen Untereinheit p110 an die Plasmamembran rekrutiert wird, wo sie das PIP₂ (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) zu PIP₃ (Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat) phosphoryliert. Daraufhin werden Proteine mit einer PH-Domäne (Pleckstrin Homologie Domäne) wie Akt und PDK (Phosphoinositide dependent kinase) zur Plasmamembran transloziert und aktiviert. Durch Phosphorylierung werden pro-apoptotische Proteine gehemmt, wie Caspase-9 und BAD (*Bcl-2-associated death promoter*), welches vom Bcl-2/Bcl-X_L (B-cell lymphoma-2/ B-cell lymphoma-extra large)-Komplex dissoziiert. Transkriptionsfaktoren, wie NF-κB werden aktiviert, was in der Transkription von überlebensfördernden Genen resultiert (Jimenez et al., 2002; Yang, 2009; Watson et al., 2011). (nach Cooray, 2004).

In traditionellen transgenen Modelltieren wird die direkte Expression eines Onkogens in allen Zellen des Zielgewebes angestrebt. Dies kann jedoch zu einem supraphysiologischen Expressionslevel führen (Johnson *et al.*, 2001). Bei dem von Johnson *et al.* etablierten K-ras Modell, beheimaten die Mäuse latente, onkogene K-ras-Allele, welche nur spontan durch somatische intrachromosomale Rekombination *in vivo* aktiviert werden können. Bei der Gewinnung der Mäuse wird mit Hilfe einer variierten „Hit-and-run“-Technik ein Vektor, mit einer aktivierenden Glycin-zu-Asparaginsäure-Mutation im Codon 12 des K-ras Exon 1 mit dem Wildtyp-Allel in kultivierten Stammzellen rekombiniert, so dass ein sogenanntes „targeted“ Allel mit einer identischen Verdopplung des Ziellocus entsteht („Hit“-Schritt) (Johnson *et al.*, 2001). Nach Injektion dieser Stammzellen in eine Mausblastozyste, Integration in die Keimbahn und Weitergabe des Allels an die Nachkommen, erfolgt die Exzision eines der verdoppelten Zielloci durch intrachromosomale Rekombination oder durch ungleichen Austausch von Schwesterchromatiden *in vivo* („run“-Schritt)(Johnson *et al.*, 2001). Da es sich bei dem K-ras^{LA2}-Allel um zweimal den gleichen Locus handelt, bleibt nach Exzision eines Locus in 100 % der Fälle bei den chimären Jungtieren ein mutierter Locus übrig. Durch gezielte Verpaarung der chimären Mäuse mit gesunden Tieren entstehen heterozygote, den Knock-in in allen Zellen tragende Nachkommen. Die auf diese Weise genetisch modifizierten Tiere entwickeln zu 100 %, ab der ersten Woche, in der Lunge multifokale Tumoren unterschiedlicher Stadien, die sich innerhalb von 150 Tagen zu fortgeschrittenen Adenokarzinomen entwickeln. Weniger oft treten Metastasen in thorakalen Lymphknoten, Nieren und anderen viszerale Organen auf. Zudem weisen jeweils 30 % der Tiere ein Thymuslymphom oder Hautpapillome auf (Johnson *et al.*, 2001). Die Mauslinie wurde über Blastozysten-Injektion generiert, stellt einen Inzuchtstamm dar und beruht aktuell auf einem C57BL/6-Hintergrund.

1.1.7.3 SP-C-c-raf-1-BxB-23

Die raf-Proteinfamilie umfasst bei Säugetieren drei Mitglieder: A-raf, B-raf und c-raf. Sie gehören zu den Serin-Threonin-Kinasen und werden gewebespezifisch exprimiert. A-raf wird primär in urogenitalem Gewebe lokalisiert, B-raf in neuronalem Gewebe und Hoden und c-raf tritt ubiquitär auf (Pearson *et al.*, 2001). Anders als bei ras-Mutationen treten aktivierende raf-Mutationen bei Lungenneoplasien seltener auf und konnten *in vivo* nur für B-raf gefunden werden (Rodenhuis *et al.*, 1988; Brose *et al.*, 2002; Naoki *et al.*, 2002). Jedoch können regelmäßig Überexpressionen von c-raf, vermutlich durch Gen-Neuanordnung, in humanen Adenokarzinomen beobachtet werden (Cekanova *et al.*, 2007; Palanisamy *et al.*, 2010). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass c-raf und nicht b-raf das Mitglied der raf-Kinasen-Familie darstellt, welches an, durch K-ras verursachte, nicht-kleinzellige Lungenkarzinome beteiligt ist (Blasco *et al.*, 2011). Wie in Abbildung 1.3 ersichtlich, handelt es sich bei c-raf um eine Effektorkinase des ras-Signaltransduktionsweges. Die raf-Moleküle liegen am Kopf einer Kaskade, die von aktivierten Rezeptor-Tyrosinkinasen und dem Guaninnukleotid-Bindeprotein ras reguliert wird (Kerkhoff *et al.*, 2000). Aktiviertes ras-GTP vermag das raf-Protein in Richtung Zellmembran zu dislozieren, was zur Aktivierung der ras-Kinase führt. Sie leitet das Signal dann im sogenannten MAP-Kinase-Weg über eine Kaskade von aufeinanderfolgenden Phosphorylierungen in den Nukleus weiter (Avruch *et al.*, 1994; Daum *et al.*, 1994). Darüber hinaus wirken raf-Kinasen als aktivierende Schaltmoleküle auch in anderen Signalwegen. So kooperiert z.B. c-raf mit bcl-2 an der äußeren Mitochondrienmembran, um die Freisetzung von Cytochrom c und Apoptose zu verhindern (Troppmair *et al.*, 1992; Fedorov *et al.*, 2002).

SP-C-c-raf-1-BxB-23 transgene Mäuse tragen eine transformierende Variante von c-raf in Typ II Pneumozyten der Lunge. Diesem c-raf-BxB Protein fehlt der regulatorische NH₂-Terminus, inklusive der ras-Bindungsstelle, so dass es dadurch konstitutiv aktiviert ist (Kerkhoff *et al.*, 2000). Durch die Bindung an den 3,7 kb Surfactant-Protein-C (SP-C) Promoter, wird auf DNA-Ebene eine Lungenepithel-spezifische Expression des verkürzten c-raf-BxB-Gens in Typ II

Pneumozyten und einer Subpopulation von bronchialen Clara-Zellen ermöglicht (Glasser *et al.*, 1991; Perl *et al.*, 2002). SP-C-c-raf-1-BxB-23-Mäuse entwickeln zu 100 % in 1 bis 2 Monaten gutartige Neoplasien der Lunge, die nach 5-7 Monaten als multiple adenomatöse Foci vorliegen. Diese Adenome zeigen ein glanduläres Tumorzellwachstum mit lepidischem, manchmal mikropapillärem Wachstumsmuster mit fehlender Blutgefäßinvasion und spärlicher Vaskularisierung. Sie sind histologisch und genetisch stabil und es findet keine Progression zu Karzinomen statt (Kerkhoff *et al.*, 2000; Ceteci *et al.*, 2007). Diese transgene Mauslinie wurde über Pronukleus-Injektion generiert. Sie beruht auf einem gemixten Hintergrund und wird über das Zuchtschema der Inzucht erhalten.

1.2 Pulmonale Hypertonie

1.2.1 Definition

Entsprechend den Richtlinien der „European Society of Cardiology“ wird die pulmonale Hypertonie definiert als eine anhaltende Überschreitung des mittleren pulmonalarteriellen Drucks von 25 mmHg unter Ruhebedingungen (Galie *et al.*, 2004). Unter physiologischen Bedingungen beträgt der mittlere pulmonalarterielle Druck in Ruhe 14 ± 3 mmHg, kann jedoch durchaus Werte von 20 mmHg erreichen (Badesch *et al.*, 2009; Kovacs *et al.*, 2009). Werte zwischen 21 und 24 mmHg werden als nicht signifikant angesehen und bedürfen näherer Betrachtung (Galie *et al.*, 2010). Als Konsequenz eines erhöhten pulmonalarteriellen Drucks steigt die rechtsventrikuläre Nachlast, die letztendlich in Rechtsherzversagen und Tod gipfelt.

1.2.2 Vorkommen

Pulmonale Hypertonie ist eine schwerwiegende, unheilbare Erkrankung. Weltweit betrifft sie mehr als 25 Millionen Menschen und gehört somit zu den häufigen Erkrankungen. In der Mehrzahl der Fälle ist sie auf eine Linksherzinsuffizienz zurückzuführen (Elliott *et al.*, 2010; Strange *et al.*, 2012). Andere auslösende Primärerkrankungen, wie z.B. Schistosomiasis, hämolytische Anämie und HIV-Infektionen, die regional gehäuft auftreten, bedingen zudem weltweit stark variierende Prävalenzen von pulmonaler Hypertonie (Elliott *et al.*, 2010). Die idiopathische Form der pulmonalarteriellen Hypertonie (IPAH) weist im Gegensatz dazu pro Jahr Inzidenzen von nur einem neuen Fall in Europa resp. drei Fällen in Nordamerika auf (Humbert *et al.*, 2006; Peacock *et al.*, 2007; Taichman und Mandel, 2007).

Unbehandelte pulmonalarterielle Hypertonie, als chronische Herz-, Lungen- und letztlich Systemerkrankung, geht aufgrund der hohen Mortalität und Morbidität mit starken Einschränkungen und einem medianen Überleben von unter 3 Jahren einher (D'Alonzo *et al.*, 1991; Barst, 1996).

1.2.3 Klassifikation

2008 wurde die aktuelle Klassifikation der pulmonalen Hypertonie auf dem vierten Weltkongress zur pulmonalen Hypertonie in Dana Point erstellt. Man unterteilt die pulmonale Hypertonie in 5 Gruppen, die sich durch unterschiedliche Ätiologien voneinander abgrenzen, jedoch im Krankheitsgeschehen, dem histologischen Erschein und den Symptomen Gemeinsamkeiten aufzeigen (Jain *et al.*, 2007).

Tabelle 1.3: Klassifikation der pulmonalen Hypertonie vom 4. Weltkongress zur pulmonalen Hypertonie in Dana Point (nach Simonneau *et al.*, 2009)

<p>1. Pulmonalarterielle Hypertonie</p> <p>1.1 Idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie (IPAH)</p> <p>1.2 Familiäre pulmonalarterielle Hypertonie (FPAH) (BMPR2 Genmutation; ALK1; Endoglin Genmutation; unbekannte Ursache)</p> <p>1.3 Arzneimittel- und Toxin-induziert</p> <p>1.4 Assoziierte pulmonalarterielle Hypertonie (APAH) (Kollagenosen; HIV-Infektionen; Portale Hypertonie; Kongenitale Herzerkrankungen; Schistosomiasis; Chronische hämolytische Anämie)</p> <p>1.5 Persistierende pulmonalarterielle Hypertonie bei Neugeborenen</p> <p>1'. Pulmonale venookklusive Erkrankung (PVOD) und/oder pulmonale kapilläre Hämangiomatose (PCH)</p> <p>2. Pulmonale Hypertonie bei Erkrankungen des linken Herzens</p> <p>2.1 Systolische Dysfunktion</p> <p>2.2 Diastolische Dysfunktion</p> <p>2.3 Erkrankungen der Herzklappen</p> <p>3. Pulmonale Hypertonie bei Lungenerkrankung und/oder Hypoxie</p> <p>3.1 Chronisch obstruktive Lungenerkrankung</p> <p>3.2 Interstitielle Lungenerkrankung</p> <p>3.3 Andere restriktiv und obstruktiv gemischte pulmonale Erkrankungen</p> <p>3.4 Schlafapnoe-Syndrom</p> <p>3.5 Alveoläre Hyperventilation</p> <p>3.6 Chronische Höhenkrankheit</p> <p>3.7 Fehlbildungen in der Entwicklung</p> <p>4. Chronische thrombembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH)</p> <p>5. Pulmonale Hypertonie mit unklaren und/oder multifaktoriellen Mechanismen</p> <p>5.1 Hämatologische Erkrankungen: Myeloproliferative Erkrankungen, Splenektomie</p> <p>5.2 Systemische Erkrankungen: Sarkoidose, pulmonale Langerhanszellenhistiozytose, Lymphangioleiomyomatose, Neurofibromatose, Vaskulitis</p> <p>5.3 Metabolische Erkrankungen: Glykogenspeicherkrankheit, Morbus Gaucher, Schilddrüsenerkrankungen</p> <p>5.4 Andere: Obstruktion durch Tumore, fibrosierende Mediastinitis, chronischer Nierenausfall mit Dialyse</p>

Die pulmonalarterielle Hypertonie (Gruppe 1) stellt ein intrinsisches Krankheitsgeschehen der pulmonalvaskulären glatten Muskelzellen und Endothelzellen mit Abnormalitäten auf zellulärer und molekularer Ebene dar. Diese Abweichungen beruhen auf idiopathischen, erblichen oder erworbenen Faktoren (Rubin, 1997; Mandegar *et al.*, 2004). Pulmonale Hypertonie kann ebenfalls eingeleitet werden, wie in den Gruppen 2, 3, 4 und 5, durch pathologische Gegebenheiten, die unabhängig und in Abwesenheit von pulmonalen Gefäßerkrankungen entstehen. Zu diesen Prozessen gehören mechanische Obstruktion und Verengung der großen Pulmonalarterien, Erkrankungen des Lungenparenchyms mit Beeinträchtigung des Lungengefäßbettes und der Mikrozirkulation, chronische Hypoxie, chronisch erhöhter Blutfluss im pulmonalen Gefäßsystem, Verstärkung des Strömungswiderstandes gegen den venösen Abfluss und Kombinationen aus den oben genannten Prozessen (Mandegar *et al.*, 2004).

1.2.4 Pathophysiologie

Die pulmonale Zirkulation stellt ein System mit hoher Flussrate, geringem Widerstand und geringem Druck dar. Das Krankheitsgeschehen der pulmonalen Hypertonie beruht auf einem Teufelskreis, bei dem ein Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks über nachgeschaltete, alterierte Genexpression pulmonalarterielle Gefäßumbauprozesse initiieren. Diese führen zu erhöhten Scherkräften, einer verminderten Compliance und erhöhtem Widerstand der pulmonalen Arterien, die erneut den pulmonalarteriellen Druck ansteigen lassen (Mandegar *et al.*, 2004).

Die wichtigsten morphologischen Charakteristika der pulmonalarteriellen Hypertonie stellen die Gefäßumbauprozesse, die Vasokonstriktion und In-Situ-Thromben dar (Mandegar *et al.*, 2004).

Der Prozess des strukturellen Gefäßumbaus, auch „Remodeling“ genannt, betrifft alle Schichten der Gefäßwand kleiner Pulmonalarterien, von der *Tunica intima*, bestehend aus dem Endothel und der *Membrana elastica interna*, der *Tunica media*, aufgebaut aus geschichteten glatten Muskelzellen und der *Membrana elastica externa*, bis hin zur *Adventitia* oder *Tunica externa* aus lockerem Bindegewebe.

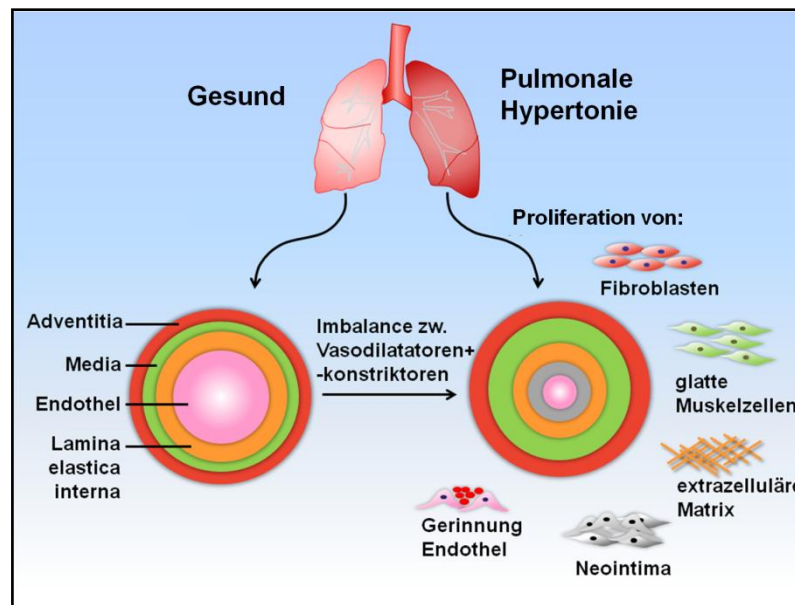


Abbildung 1.4: Pathomechanismus der pulmonalen Hypertonie (nach Pullamsetti und Schermuly, 2009)

Histologisch betrachtet stellen sich die umgebauten Gefäße beim vaskulären Remodeling als obliterierte kleine bis mittlere Pulmonalarterien in Kombination mit konzentrischer Intima-Fibrose, Mediahypertrophie, fibrinoider Degeneration und Bildung von Neointima und plexiformen Läsionen dar (Mandegar *et al.*, 2004). Neointima entsteht nach Eindringen von Myofibroblasten in Zusammenhang mit Ablagerung von extrazellulärer Matrix zwischen Endothel und *Lamina elastica interna* (Humbert *et al.*, 2004). Plexiforme Läsionen treten in kleinen Arterien und Arteriolen auf und stellen sich als Kapillarbüschel aus Endothelzellen und Myofibroblasten dar, inmitten Aneurysma-ähnlich ausgedehnter, dünnwandiger Arterien (Mandegar *et al.*, 2004; Stenmark *et al.*, 2009). Die Myofibroblasten entstammen dabei vermutlich glatten Muskelzellen der Media, adventitialen Fibroblasten, zirkulierenden Fibrozyten oder Endothelzellen nach endothelial-mesenchymaler Transition (Frid *et al.*, 2006; Stenmark *et al.*, 2006; Morrell *et al.*, 2009).

Das vaskuläre Remodeling beruht auf einer Vielzahl unterschiedlicher Pathomechanismen. Erhöhte zytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentrationen ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zytoplasmatisch}}$), aber auch gesteigerte Ca^{2+} -Konzentrationen im sarkoplasmatischen Retikulum ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$) der glatten Muskelzelle, verleiten ruhende

Zellen dazu in den Zellzyklus einzutreten und vermehrt pro-proliferative Transkriptionsfaktoren, wie c-fos und c-jun zu exprimieren (Hardingham *et al.*, 1997). Dies kann zu einer erhöhten Expression responsiver Gene, v.a. Wachstumsfaktoren wie Endothelin-1 (ET-1), Blutplättchen-Wachstumsfaktor (PDGF) und VEGF führen, deren Expression bereits von Faller bei pulmonaler Hypertonie durch chronische Hypoxie nachgewiesen wurde (Faller, 1999; Fantozzi *et al.*, 2003; Mandegar *et al.*, 2004). Vermehrte Proliferation von Fibroblasten der Adventitia ausgelöst durch Hypoxie, sowie deren Transdifferenzierung zu Myofibroblasten können zu dem Bild der pulmonalen Hypertonie beitragen, bei dem zunächst unmuskularisierte Gefäße im Laufe der Erkrankung eine vollständige Muskularisierung entwickeln, was zu einer Obliteration des Gefäßlumens und einer Gefäßkonstriktion führt (Stenmark *et al.*, 1995; Stenmark *et al.*, 2002; Schermuly und Grimminger, 2008). Apoptose-hemmende Effekte werden durch vermindert exprimierte oder funktionell eingeschränkte K^+ -Kanäle in glatten Muskelzellen erreicht, indem der apoptotische Volumenabbau und die nötige Caspasen-Aktivität inhibiert werden (Zhang *et al.*, 2003; Mandegar *et al.*, 2004).

Vasokonstriktion, als zweites wichtiges pathohistologisches Charakteristikum der pulmonalen Hypertonie, resultiert aus einer Erhöhung des $[Ca^{2+}]_{\text{zytoplasmatisch}}$ -Spiegels durch transsarcolemmalen Influx über spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle bei einer, durch inhibierte K^+ -Kanäle, verlängerten Depolarisation und Mobilisation von Ca^{2+} aus dem sarcoplasmatischen Retikulum (Berridge, 1993; Blaustein, 1993; Yuan JX *et al.*, 1998; Yuan XJ *et al.*, 1998). Signaltransduktionswege wie Proteinkinase C, Tyrosinkinasen, Rho-Kinasen oder den MAP-Kinaseweg sollen nach Hypoxie-Exposition zu dieser Ca^{2+} -Sensibilisierung führen (Dipp *et al.*, 2001; Robertson *et al.*, 2001; Robertson und McMurtry, 2004). Erhöhte $[Ca^{2+}]_{\text{zytoplasmatisch}}$ ermöglichen in den glatten Muskelzellen ein Verschieben der Myosinköpfe auf den Aktinfilamenten unter ATP-Verbrauch, um auf diese Weise die Kontraktion der Zelle herbeizuführen (Somlyo und Somlyo, 1994).

Eine Veränderung des Gefäßtonus bei pulmonaler Hypertonie beruht zusätzlich auf einem Ungleichgewicht zwischen sezernierten Vasokonstriktoren und Vasodilatoren. Grund dafür scheint eine Funktionsbeeinträchtigung des

Gefäßendothels, die sogenannte „endotheliale Dysfunktion“ zu sein. So treten, neben der peripheren Produktion von Serotonin durch enterochromaffine Zellen des Darms, lokal erhöhte Konzentrationen von Serotonin in der direkten Umgebung von Endothel- und glatten Muskelzellen auf, die womöglich auf die Sekretion von Endothelzellen, neuroendokrinen Zellen, neuroepithelialen Körpern und möglicherweise glatten Muskelzellen zurückzuführen sind. So übt Serotonin einen vasokonstriktischen und mitogenen Effekt aus, entweder direkt über Serotonin-Rezeptoren, die überwiegend in glatten Muskelzellen vorkommen oder über den Serotonin-Transporter (MacLean *et al.*, 1996; Miyata *et al.*, 2001). Weitere vasokonstriktive Faktoren repräsentieren Endothelin-1 und Thromboxan A2, die vasokonstriktische, mitogene und plättchenaggregierende Funktionen ausüben und vermehrt in IPAH-Patienten synthetisiert werden (Robbins *et al.*, 2001; Mandegar *et al.*, 2004). Die endotheliale Dysfunktion führt ebenfalls zu einer chronisch beeinträchtigten Produktion von Vasodilatoren wie Stickstoffmonoxid (NO) und Prostazyklin. NO, dessen Bildung durch die NO-Synthasen katalysiert wird, inhibiert, unter physiologischen Umständen durch Produktion von zyklischem Guanosinmonophosphat, das Wachstum und die Konstriktion von glatten Muskelzellen, sowie die Aggregation von Plättchen (Singh und Evans, 1997). Diese hemmende Wirkung ist vermindert bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie, die eine verringerte Expression von NO-Synthase III aufweisen (Giaid und Saleh, 1995). Eine identische Wirkung wird durch Hemmung von Prostazyklin oder Prostaglandin I₂ (PGI₂) erreicht, wie dokumentiert bei pulmonalarteriellen Hochdruckpatienten mit PGI₂- und PGI₂-Synthase-Mangel (Christman *et al.*, 1992). Ein weiterer, bei IPAH-Patienten nur in niedrigen Serumkonzentrationen auftretender Vasodilatator, ist der Neurotransmitter vasoaktives intestinales Peptid (VIP). Unter physiologischen Umständen wirkt es systemisch und pulmonal gefäßerweiternd, inhibiert die Proliferation glatter Muskelzellen und die Aggregation von Plättchen (Humbert *et al.*, 2004).

Der dritte pathophysiologische Parameter repräsentiert die In-situ-Thrombose. Sie ist zurückzuführen auf die endotheliale Dysfunktion nach Einwirkung erhöhter Scherkräfte oder nach vaskulären Beschädigungen und ist bedingt durch

Interaktionen zwischen Endothelzellen, Wachstumsfaktoren und Plättchen (Humbert *et al.*, 2004; Mandegar *et al.*, 2004). Dies führt zu einem prokoagulatorischen Milieu im pulmonalen Gefäßsystem, wie ersichtlich aus der Tatsache, dass in 70 % der IPAH-Patienten eine verminderte fibrinolytische Aktivität und erhöhte Spiegel an Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren nachgewiesen wurden (Welsh *et al.*, 1996).

Anschließend an die Gefäßumbauprozesse verursacht pulmonale Hypertonie durch Anstieg des pulmonalvaskulären Widerstands eine erhöhte rechtsventrikuläre Nachlast, die schließlich zu einer adaptiven Rechtsherzhypertrophie führt (Mandegar *et al.*, 2004). Dies ist das Resultat einer gesteigerten Proteinbiosynthese und einer Zunahme der Zellgröße, aufgrund von überzähligen Sarkomeren, zusammen mit einer vermehrten Synthese von extrazellulärer Matrix, v.a. Kollagen (Bogaard *et al.*, 2009). Eine verstärkte Nachlast wird dabei von Integrinen und dehnungsaktivierten Ionenkanälen auf Myozyten, Fibroblasten und Endothelzellen des rechten Ventrikels wahrgenommen. Anschließend wird die Proteinbiosynthese angepasst (Bogaard *et al.*, 2009). Verstärkt wird diese Reaktion durch systemische, neurohormonelle Einflüsse, wie z.B. durch Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems und des Sympathikus (Bogaard *et al.*, 2009). Diese Rechtsherzhypertrophie, auch *Cor pulmonale* genannt, kann die Kreislauffunktion eine gewisse Zeit aufrechterhalten. Da die Herzkammer jedoch nur limitiert an Größe zunehmen kann, erfolgen, nach Erreichen des kritischen Punkts, an dem die Nährstoffversorgung und das Auswurfvolumen nicht mehr ausreichen, Rechtsherzdilatation und Rechtsherzversagen, die zum Tod des Patienten führen (Böcker *et al.*, 2004).

1.2.5 Therapie

Während es in der Therapie der pulmonalen Hypertonie noch vor wenigen Jahren, außer der Lungentransplantation, keine Behandlungsmöglichkeiten gab, stehen seit Mitte der 90er Jahre neue Therapeutika zur Verfügung. Sie verbessern sowohl die körperliche Verfassung, die durch einen 6-minütigen Gehtest bestimmt wird,

als auch die kardiopulmonale Situation, so dass heute die partielle Umkehr im Krankheitsverlauf schwerer pulmonaler Hypertonie gelingen kann (Elliott *et al.*, 2010). So können die meisten Patienten heute mit Endothelinrezeptorantagonisten (z.B. Bosentan, Ambrisentan), Phosphodiesterase 5-Inhibitoren (z.B. Sildenafil, Tadalafil) und/oder Prostanoiden (z.B. Iloprost) wirksam behandelt werden. Zudem vermögen Inhalation von NO, Adenosin oder Ca²⁺-Kanal-Blocker bei 20-25 % der Patienten den pulmonalvaskulären Widerstand und den mittleren pulmonal-arteriellen Druck um 15-20 % zu senken (Mandegar *et al.*, 2004). Dazu erfolgt meist eine adjuvante Therapie mit Antikoagulantien, Diuretika, Sauerstoff und inotrop-wirksamen Substanzen (Stenmark *et al.*, 2009). Die aktive Behandlung der pulmonalen Hypertonie geht mit einer um 43 % reduzierten Mortalität einher, was aber nichts an der Tatsache ändert, dass die Mortalität immer noch hoch ist und die körperlichen Beeinträchtigungen stark (Galie *et al.*, 2009b). Daher wird ständig nach neuen Therapiemöglichkeiten geforscht.

1.2.6 Immunzellen bei pulmonaler Hypertonie

In der bindegewebigen Adventitia, der äußersten Schicht der Gefäßwand, findet häufig, v.a. bei schwerer pulmonaler Hypertonie und IPAH eine entzündliche Reaktion statt (Caslin *et al.*, 1990; Tudor *et al.*, 1994). In vielen plexiformen Läsionen können zudem perivaskuläre Zellinfiltrate von Immunzellen beobachtet werden (Tudor *et al.*, 2007). Die sich dort in großen Mengen ansammelnden Makrophagen, T- und B-Lymphozyten und dendritische Zellen sind in der Lage die Proliferation der darunterliegenden Gefäßschichten durch Freigabe von Wachstumsfaktoren und Chemokinen zu fördern, so dass eine ausgesprochene Korrelation zwischen dem vaskulären Remodeling und dem Auftreten eines Entzündungsgeschehens besteht (Bonnet *et al.*, 2007b; Perros *et al.*, 2007; Schermuly und Grimminger, 2008; Stenmark *et al.*, 2009). Umgebaute Pulmonalarterien exprimieren die proinflammatorischen Zytokine IL-1 und IL-6, PDGF, VEGF, CXCL12 und dessen korrespondierenden Rezeptor CXCR4, das Makrophagen entzündliche Protein-1 α /CCL3 und das Chemokin RANTES/CCL-5 (Akronym für regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted)

aus Endothelzellen, das in der Lage ist Monozyten und T-Zellen zu rekrutieren (Tuder *et al.*, 2007; Burke *et al.*, 2009). Zudem zeigen Lungen von IPAH-Patienten erhöhte Expressionen von Fractalkinen, was bei der Rekrutierung von T-Zellen und Monozyten und Adhäsion von T-Zellen an das Endothel eine Rolle spielt (Balabanian *et al.*, 2002; Steiner *et al.*, 2009).

1.2.6.1 T-Lymphozyten

Der Beitrag der T-Lymphozyten zur Entwicklung von pulmonaler Hypertonie ist ungeklärt. Es stellen sich jedoch bei Savai *et al.* vermehrt T-Lymphozyten in der vaskulären Adventitia von IPAH-Patienten dar, von denen CD8⁺ zytotoxische T-Zellen den prädominierenden Anteil darstellen (Savai *et al.*, 2012). Sie könnten mit einer Deregulierung von Apoptose und Antiapoptose, sowie mit einer vermehrten Produktion von VEGF in Verbindung gebracht werden (Freeman *et al.*, 1995; Levy *et al.*, 2007). Zudem stellt die Hochregulierung des Transkriptionsfaktors „nuclear factor of activated T cells“, der für Zytokine kodiert, ein Zeichen dar für den Beitrag von T-Zellen zum Remodeling in pulmonalarteriellen Hochdruckpatienten (Bonnet *et al.*, 2007b). T-Helferzellen tragen ebenfalls zum Gefäßumbauprozess bei, indem sie die Proliferation und Differenzierung von glatten Muskelzellen stimulieren (Daley *et al.*, 2008). Zudem wurden erhöhte Anzahlen zirkulierender CD4⁺ CD25⁺ T-regulatorischer Zellen bei IPAH-Patienten nachgewiesen (Ulrich *et al.*, 2008). Sie regeln die Funktion von Th1 und Th2-Helferzellen und dienen der Aufrechterhaltung der immunologischen Toleranz. Demgegenüber stehen jedoch Beobachtungen, die mit einem verminderten Auftreten von T-regulatorischen Zellen einhergehen und somit eine Brücke zu der, in IPAH beschriebenen, immunen Dysregulation schlagen (Nicolls *et al.*, 2005; Savai *et al.*, 2012).

1.2.6.2 Makrophagen

Der Vorgang der Entzündung scheint eine signifikante Rolle in Hypoxie-induziertem vaskulären Remodeling zu spielen, da bereits früh mononukleäre Zellinfiltrate im Rahmen einer spezifischen pulmonalvaskulären Immunantwort nachgewiesen werden konnten (Burke *et al.*, 2009). Savai *et al.* konnten eine signifikante Anhäufung von Makrophagen in der Adventitia pulmonaler Gefäße nachweisen (Savai *et al.*, 2012). Neben Zytokinen, reaktiven Sauerstoffspezies und vasoaktiven Molekülen, wie Endothelinen und Eikosanoiden, sezernieren sie Matrixmetalloproteasen und Serinproteasen, die es Ihnen ermöglichen Basalmembranen und extrazelluläre Matrix abzubauen und möglicherweise die Leukozytenmigration, Fibroblastenaktivierung oder deren Transdifferenzierung zu stimulieren (Stenmark *et al.*, 2005; Frid *et al.*, 2006; Burke *et al.*, 2009; Hall *et al.*, 2009). Neben ihrer weiteren Tätigkeit Antigene den T-Zellen zu präsentieren, wurde kürzlich vorgeschlagen, dass Makrophagen den alternativen M2-Phänotypen als Reaktion auf Sauerstoffmangel ausbilden (Vergadi *et al.*, 2011).

1.2.6.3 Dendritische Zellen

In pulmonalen Arterien von IPAH-Patienten und Modellen experimenteller pulmonaler Hypertonie kommen dendritische Zellen in signifikant erhöhten Mengen in der Adventitia vor (Perros *et al.*, 2007; Savai *et al.*, 2012). Die Anzahl zirkulierender dendritischer Zellen im Blut von IPAH-Patienten ist reduziert, was deren Rekrutierung in die Lunge impliziert, um dort möglicherweise in Kontakt mit T-Zellen zu treten und um diese zu restimulieren (Hall *et al.*, 2009; Savai *et al.*, 2012). Zudem verleiht ihre Fähigkeit sich zu einem divergierenden Zellphänotypen, wie z.B. Endothelzellen, zu differenzieren, den dendritischen Zellen eine Schlüsselfunktion in der Modulation des gesamten Umbauprozesses (Conejo-Garcia *et al.*, 2004).

1.3 Vom Lungentumor zur pulmonalen Hypertonie

Nach einer asymptomatischen Phase von durchschnittlich 2 Jahren tritt Dyspnoe als häufigstes Symptom bei etwa 60 % aller an idiopathischer pulmonaler Hypertonie leidenden Patienten auf (Rich *et al.*, 1987). Bei primären Lungenkrebspatienten stellt, laut La Due, diese Schweratmigkeit jedoch bei nur 2 % der Erkrankten das erste Symptom dar (LaDue, 1968). Bei Erstvorstellung tritt sie bereits bei 60-70 % der Patienten auf und bei nicht weniger als 90 % aller Lungenkrebspatienten wird sie vor dem *Exitus letalis* beobachtet (Smith *et al.*, 2001; Henoch *et al.*, 2008; Reddy *et al.*, 2009). Zwischen Krebs und pulmonaler Hypertonie bestehen kausale Beziehungen, die bislang zwei Mechanismen umfassen: die Thrombembolie und die Tumorzellembolie. Dyspnoe stellt dabei, auf dem Weg vom Krebs zu pulmonaler Hypertonie, eines der wichtigsten klinischen Symptome dieser Komplikation dar.

1.3.1 Thrombembolien

Venöse Thrombembolien sind weitverbreitete Komplikationen bei Krebspatienten. Lungenkrebs geht nach Literaturangaben mit einem etwa 22-fach erhöhtem Thromboserisiko einher (Noble und Pasi, 2010).

Wird eine akute Episode venöser Thrombembolie überlebt, kann sich anschließend ein Rezidiv, das post-thrombotische Syndrom mit Gliedmaßen-schmerzen, Fibrose und Ulzerationen, oder aber die chronische thromb-embolische Form der pulmonalen Hypertonie (CTEPH) entwickeln (Noble und Pasi, 2010). Venöse Thrombembolien, als mögliche Ursache von CTEPH, treten im Zusammenhang mit Krebs v.a. in den ersten Monaten nach Diagnosestellung auf und bei Vorhandensein von entfernten Metastasen (Blom *et al.*, 2005). Tumorzellen sind in der Lage die Blutgerinnung über diverse Mechanismen zu aktivieren. Dazu gehören die Produktion von prokoagulatorischen Faktoren, die Sekretion von proinflammatorischen und proangiogenen Zytokinen und direkte Interaktionen mit Endothelzellen, Leukozyten und Plättchen über Adhäsionsmoleküle (Noble und Pasi, 2010). Prädisponierend wirken dabei die oft

fehlende Mobilität von Krebspatienten im Endstadium, sowie die Krebstherapie selbst (Dvorak, 1987; Blom *et al.*, 2005).

Wird eine akute pulmonale Thrombembolie überlebt, erfolgt, unter physiologischen Umständen, die Resorption des Blutkoagels durch Steigerung der lokalen Fibrinolyseaktivität mit kompletter Wiederherstellung des pulmonalen Gefäßbetts. In 0,1-0,4 % der Fälle, aus ungeklärter Ursache, findet keine Resorption statt und der Thrombembolus entwickelt sich zu einem fibrös organisierten Gerinnsel, wobei vermutlich pathologische Gegebenheiten in der Hämostase oder Fibrinolyse, sowie Rezidive zu dem Krankheitsgeschehen beitragen (Dartevelle *et al.*, 2004). Dieses Geschehnis markiert den Beginn der CTEPH. Die Organisation des Blutkoagels in pulmonalen Arterien geht dabei mit dem Verschwinden der Intima und einer Infiltration der Media am Ort der Embolie einher (Daily, 1995). Im intraperikardialen Segment der Pulmonalarterie beginnt zudem die Ausbildung einer pseudointimalen fibrösen Verdickung, die sich progressiv hin zu den lobaren und segmentalen Arterien verstärkt, um diese schließlich komplett zu verlegen (Dartevelle *et al.*, 2004). In den postobstruktiven Gefäßen weitet sich die Vaskulopathie aus auf die Bildung präkapillärer Anastomosen zwischen bronchialen und pulmonalen Gefäßen (Fadel *et al.*, 2000). In der Mehrzahl der Fälle von CTEPH sind >40 % des pulmonal vaskulären Gefäßbetts verlegt (Dartevelle *et al.*, 2004).

Gemeinhin vergeht ein „Flitterwochen“-Zeitraum zwischen der akuten pulmonalen Thrombembolie und dem Erscheinen erster Symptome von pulmonaler Hypertonie (Moser *et al.*, 1987; Moser *et al.*, 1990; Moser *et al.*, 1992). Gelegentlich vergehen jedoch Jahre bis Dyspnoe auftritt, was nicht, wie eventuell zu erwarten, mit einer Rezidive einhergeht, sondern zurückzuführen ist auf lokale Thrombenbildung, aufgrund verlangsamten Blutflusses in verlegten pulmonalen Arterien, oder auf Arteritiden in nicht-obstruierten Gefäßen (Dartevelle *et al.*, 2004).

1.3.2 Tumorzellembolien

Im Gegensatz zu Thromben sind Tumorzellen in der Lage das pulmonale Gefäßsystem auf vielfältige Art und Weise zu beeinflussen: mittels großer, proximaler Emboli, die die Hauptpulmonalarterien oder die großen segmentalen Rami verlegen können, mittels lymphangischer Karzinomatose oder mittels Tumorzellmikroembolien (Kane *et al.*, 1975; Fanta und Compton, 1980). Während pulmonale Tumorembolien als das Vorhandensein isolierter Zellen oder Tumorzellbündel im pulmonalarteriellen System definiert sind, ist die Tumorzellmikroembolie dadurch charakterisiert, kleine Pulmonalarterien, Arteriolen und Kapillaren der alveolaren Septa oft in Kombination mit Thromben zu verschließen (Kane *et al.*, 1975; Mehrishi *et al.*, 2004). Lymphangische Karzinomatose stellt das Tumorwachstum in bronchovaskulären, interlobulär-septalen und subpleuralen lymphatischen Gefäßen dar. Tumorzellen erreichen diese lymphatischen Gefäße entweder über hämatogene Emboli mit anschließendem Durchqueren von pulmonalen Arteriolen und Kapillaren oder retrograd über den *Ductus thoracicus* oder die hilaren Lymphknoten (Mehrishi *et al.*, 2004).

Die zu beobachtenden morphologischen Veränderungen am pulmonalen Gefäßbett erstrecken sich über die kleinen Arterien und Arteriolen und stellen sich in Form intimaler Hypertrophie und Fibrose, medialer Hypertrophie und fibrinoider Nekrose der *M. elastica interna* dar, so dass sich die histologischen Merkmale bis auf das Fehlen plexiformer Läsionen nicht von denen der pulmonalen arteriellen Hypertonie unterscheiden (Shields und Edwards, 1992; Roberts *et al.*, 2003). Dieses Krankheitsbild wird auch als „Pulmonale Tumor-thrombotische Mikroangiopathie“ bezeichnet (von Herbay *et al.*, 1990). Die kardiovaskuläre Konsequenz wurde erstmals 1937 von Brill und Robertson als subakutes Auftreten eines *Cor pulmonale* infolge von multiplen Tumorzellembolien in kleinen pulmonalen Gefäßen beschrieben (Brill und Robertson, 1937). Während sich der Verlauf bei lymphangischer Karzinomatose und Tumorzellmikroembolie mit Bildung einer subakuten Rechtsherzhypertrophie progressiv darstellt, führen

große, proximale Embolien zu einem akuten Herzversagen mit Ödemen, Aszites und ventrikulärer Dilatation (Kane *et al.*, 1975; Malani *et al.*, 2007).

Die pulmonale Tumorembolie tritt in 3-26 % aller an einem soliden Tumor leidenden Patienten auf und wird nur selten vor Eintritt des Todes diagnostiziert (Kane *et al.*, 1975; Shields und Edwards, 1992; Bast *et al.*, 2000). Während pulmonale Tumorzellembolien ein nicht selten auftretendes Phänomen darstellen, stellen sie jedoch nur sporadisch die Ursache von pulmonaler Hypertonie dar. Fallbeschreibungen über nachgewiesene pulmonale Hypertonie bei verschiedenen Neoplasien, meist mit dokumentierten Metastasen, existieren in diversen Organen, wie der Blase (Roberts *et al.*, 2003), der Gallenblase (Ando *et al.*, 1997; Malani *et al.*, 2007), der Brust (Abbondanzo *et al.*, 1986; Veinot *et al.*, 1992; Hibbert und Braude, 1997; Konduri *et al.*, 2007), der Leber (Brisbane *et al.*, 1980; Wilson *et al.*, 2001), dem Kolon (Foti *et al.*, 1992), dem Magen (Kuraki *et al.*, 1997; Corradi *et al.*, 2006), dem Chorion (Graham *et al.*, 1976; Bozaci *et al.*, 2005), den Ovarien (Veinot *et al.*, 1992) und dem Herzen (Heath und Mackinnon, 1964), sowie ebenfalls in Lymphozyten (Snyder *et al.*, 1989).

Bislang wurden nur wenige Daten über das Vorkommen von pulmonaler Hypertonie bei Neoplasien der Lunge erhoben. So beschrieb Imamura den Tod eines an einem Plattenepithelkarzinom der Lunge leidenden Patienten als Folge von Herzversagen durch pulmonale Hypertonie (Imamura *et al.*, 1994). Zudem konnte der Fall eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms des rechten Bronchus mit Rechtsherzdilatation dokumentiert werden (Gelfand und Tesler, 1962). He *et al.* beobachteten das Auftreten von Tumoremboli und einer rechtsventrikulärer Hypertrophie bei einem primären pulmonalen Adenokarzinompatienten (He *et al.*, 1989). Veinot *et al.* konnten bei einem in Leber, Myokard, Haut, Milz und Nebenniere metastasierenden Adenokarzinom Tumoremboli in 50 % der kleinen bemuskelten Arterien und Arteriolen, sowie vaskuläre Umbauprozesse und Rechtsherzhypertrophie nachweisen (Veinot *et al.*, 1992). Ähnliches gelang Raper *et al.* (Raper *et al.*, 1984).

Pulmonale Tumor-thrombotische Mikroangiopathie scheint nach Angaben einer kleinen Studie von 1989 unter 200 Lungenkrebspatienten in 3 Fällen aufzutreten, wobei *Cor pulmonale* und Rechtsherzversagen nur in einem Fall in Abwesenheit

konkurrierender Erkrankungen dokumentiert wurde (von Herbay *et al.*, 1990). Gonzalez-Vitale und Garcia-Bunuel ermittelten unter 331 Patienten mit Lungenkrebs 33 Fälle von Tumorembolie, unter denen 16 Fälle mit diffuser, obliterativer intimaler Fibrose und *Cor pulmonale* auffielen, wobei Adenokarzinome häufiger als Auslöser dieses Krankheitsbildes identifiziert wurden als Plattenepithelkarzinome (Gonzalez-Vitale und Garcia-Bunuel, 1976).

Pathogenetisch erzielen Tumoremboli durch Lungenkrebs ihre Wirkung über 2 Mechanismen: Erstens können Lungentumorzellen aus dem Primärtumor oder Metastasen über Lymphgefäße und den *Ductus thoracicus* in den rechten Ventrikel und in die Pulmonalarterie gelangen (Onuigbo, 1967; Gonzalez-Vitale und Garcia-Bunuel, 1976). Zweitens ist die hämatogene Verteilung von Tumorzellen aus distalen Lungentumormetastasen z.B. aus Leber und Nebenniere zu nennen (Willis, 1973; Gonzalez-Vitale und Garcia-Bunuel, 1976).

Tumorembolien zeigen, im Gegensatz zu Thrombembolien, nur eine geringe Tendenz zur Rekanalisation, so dass sie eher zu einer progressiven, irreversiblen Obstruktion des Gefäßbetts führen (Schriner *et al.*, 1991). Zudem scheint sich das *Cor pulmonale* bei Tumorembolien schneller zu entwickeln (Mehrishi *et al.*, 2004).

1.4 Ziel der Arbeit

Das Hauptziel dieser Arbeit bestand in der Identifikation von pulmonaler Hypertonie als möglicher Auslöser der bei Lungenkrebs auftretenden Dyspnoe. Die Auswirkungen von Lungentumoren auf das pulmonale Gefäßbett wurden nur in Fallberichten genannt und bislang weder am Menschen noch an der Maus systematisch untersucht. Daher sollte, neben der Erhebung pathophysiologischer Parameter mittels Echokardiographie und hämodynamischer Messungen, ebenfalls die pathohistologische Auswertung von entnommenen Lungenproben durchgeführt werden. Dabei wurde besonderes Augenmerk sowohl auf die Lokalisation von umgebauten Gefäßen und Immunzellen als auch auf die Charakteristika der vaskulären und kardialen Umbauprozesse gelegt. Um eine möglichst breitgefächerte, deskriptive Aussage über die nachzuweisende pulmonale Hypertonie treffen zu können, standen, neben zwei histologischen Kategorien an humanen Gewebeproben (Adenokarzinome und Plattenepithelkarzinome), auch drei Mausmodelle zur Verfügung. Diese etablierten, murinen Modelle wurden so gewählt, dass sowohl ein metastatisches Modell, ein Modell mit bösartigen Adenokarzinomen der Lunge und ein gutartige Lungenadenome beherbergendes Modell Anwendung fanden. Diese Modelle zeigen nahezu identische pathophysiologische Verläufe zur Karzinogenese beim Menschen.

Es sollte daher das Vorkommen von pulmonaler Hypertonie bei Lungenkrebs untersucht werden, einem Vorgang dessen zugrundeliegende physiologische und biochemische Mechanismen ungeklärt sind. Ziel ist es möglicherweise in Zukunft die gezielte Behandlung von Dyspnoe bei Lungenkrebspatienten zu ermöglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

In der durchgeführten Arbeit wurden in den Tierexperimenten speziell für Laboruntersuchungen gezüchtete Mäuse herangezogen. Dabei handelte es sich um C57BL/6N Mäuse (adulte Tiere mit einem Gewicht von 20g bis 22g), sowie transgene Lungentumormodelle der folgenden Linien: K-ras^{LA2} (3-5 Monate alt), SP-C-c-raf-1-BxB-23 (7-9 Monate alt) (Tabelle 2.1).

Im ersten Tierversuch wurden C57BL/6N-Mäuse, welche eine intravenöse Injektion von LLC1-Zellen in die Schwanzvene erhalten haben, mit C57BL/6N verglichen, die ein identisches Volumen NaCl 0,9 % i.v. verabreicht bekommen haben.

Als Kontrolltiere für die heterozygoten Knock-in-Tiere des K-ras^{LA2}-Gens galten kommerziell erhältliche C57BL/6N-Mäuse. In der SP-C-c-raf-1-BxB-23-Guppe (vereinfacht c-raf-BxB-Gruppe) wurden die Effekte von SP-C-c-raf-1-BxB-23 bei transgenen Tieren, denen negativer Wurfgeschwister gegenübergestellt.

Beide transgenen Linien stehen unserer Arbeitsgruppe (Prof. Dr. Ulf Rapp, Dr. Rajkumar Savai, Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim, Deutschland) zur Verfügung und die Zucht wurde durch den Tierstall des Max-Planck-Instituts für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim gewährleistet.

Die C57BL/6N-Tiere wurden von der Firma Charles-River Deutschland GmbH, (Sulzfeld, Deutschland) erworben. Bei der Haltung erhielten die Mäuse Standarddiätfutter (Altromin[®]) und Wasser ad libitum bei einer durchschnittlichen Beleuchtungsdauer von dreizehn Stunden und einer Umgebungstemperatur von ca. 25 °C. Die Haltung erfolgte unter pathogenfreien Bedingungen und nach den Richtlinien für Tierexperimente der Europäischen Gemeinschaft.

Tabelle 2.1: In den Tierexperimenten verwendete Mauslinien mit genetischem Hintergrund und Herkunft

Linie	Genotyp	Hintergrund	Herkunft
C57BL/6N			Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH Sulzfeld, Deutschland
K-ras ^{LA2}	K-ras ^{LA2} Knock-in, heterozygot	C57BL/6	Prof. Dr. Tyler Jacks Koch Institute at MIT Cambridge, MA, USA
SP-C-c-raf-1-BxB-23	SP-C-c-raf-1-BxB-23 Transgen, heterozygot	C57BL/6	Prof.Dr. Ulf R. Rapp Max-Planck-Institut für Biochemie Martinsried, Deutschland

2.1.2 Tierversuchsgenehmigung

Die Genehmigung zu den durchgeführten Versuchen wurde durch das Regierungspräsidium Darmstadt erteilt und wird unter folgendem Aktenzeichen geführt: Gen. Nr. B 2/271 unter dem Titel: „Charakterisierung von pulmonaler Hypertonie in Lungenkrebs“

2.1.3 Humanes Donormaterial

2.1.3.1 Ethische Stellungnahme

Das Studienprotokoll für die Gewebespende wurde von der Ethik-Kommission des Fachbereichs Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen (Gießen, Deutschland) genehmigt, in Übereinstimmung mit nationalem Recht und den Richtlinien zur „Good Clinical Practice“ der „International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use“. Die Zustimmung wurde von dem jeweiligen Patienten oder dessen nächsten Angehörigen erbracht (AZ 31/93).

2.1.3.2 Patientenangaben**Tabelle 2.2: Patientendaten zu den verwendeten Proben mit Angabe der TNM-Klassifikation und den Ergebnissen der pathohistologischen Untersuchung**

Nr	Sex	Alter	Tumortyp	TNM	Grading
1	männlich	67	Plattenepithelkarzinom Prädominant solide ohne Keratinisierung	T1 N0 M0 R0	3
2	männlich	55	Plattenepithelkarzinom Prädominant solide ohne Keratinisierung	T2 N1 M0 V2	3
3	männlich	66	Plattenepithelkarzinom Prädominant solide ohne Keratinisierung	T1 N0 M0	2
4	weiblich	54	Plattenepithelkarzinom Prädominant solide ohne Keratinisierung	T1 N2 M0 L0 V0 R0	3
5	männlich	68	Plattenepithelkarzinom Prädominant solide ohne Keratinisierung	T2 N0 R0	2
6	männlich	71	Plattenepithelkarzinom Prädominant solide ohne Keratinisierung	T3 N0 M0 L1 V0 R1	2
7	weiblich	65	Plattenepithelkarzinom Prädominant solide ohne Keratinisierung	T1 N0 M0	2-3
8	weiblich	73	Adenokarzinom, Prädominant azinär	T1 N0 M0 R0	2
9	männlich	80	Adenokarzinom, Prädominant azinär	T3 N0 L0 V0 R0	2
10	weiblich	59	Adenokarzinom, Prädominant azinär	T2a N1 L1 V0 R0	3
11	weiblich	51	Adenokarzinom, Prädominant azinär	T2 N1 M0 L1 V0 R0	3
12	männlich	46	Adenokarzinom, Prädominant azinär	T1 N2 L1 R0	2
13	männlich	71	Adenokarzinom, Prädominant azinär	T2 N2 M2	3

Verwendet wurde humanes Lungentumorgewebe von Lungenkrebspatienten (n=13), welches während der Bronchoskopie oder Lobusresektionen entnommen wurde. Alle Proben wurden histopathologisch untersucht, in Plattenepithelkarzinome mit vorwiegend solidem Wachstumsmuster ohne Keratinisierung (n=7) und Adenokarzinome mit vorwiegend azinärem Wachstumsmuster (n=6) aufgeteilt und gemäß der TNM-Klassifikation unterschieden (Tabelle 2.2).

2.1.4 Material und Geräte für Zellkultur

2.1.4.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.3: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien für Zellkultur

Artikel	Handelsname	Hersteller
Eppendorf Pipettenaufsätze	Ep T.I.P.S. [®]	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Filter	Millex [®] GP 0,22 µm	Millipore Billerica, MA, USA
Pasteur Pipetten		Wilhelm Ulbrich GdBR Bamberg, Deutschland
Pipetten für Pipetboy	Falcon [®] (5, 10, 25, 50 ml)	Becton Dickinson Labware Le Pont de Claix, Frankreich
Pipettierhelfer	Pipetboy acu	Integra Biosciences AG Zizers, Schweiz
Tubes (15 ml, 50 ml)	Polypropylen Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflaschen 75 cm ²	Cell Star [®] Cell Culture Flasks	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland

2.1.4.2 Zellen, Medien und Substanzen

Tabelle 2.4: Übersicht der verwendeten Zellen, Medien und Substanzen für Zellkultur

Artikel	Handelsname	Hersteller
Dimethylsulfoxid	Dimethylsulfoxid D2438	Sigma Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
Dulbecco's PBS	DPBS without Mg und Ca, sterile filtered	PAN-Biotech GmbH Aidenbach, Deutschland
Einmalspritze 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml	Inject [®] Luer Solo	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Fetales Kälberserum	FBS	Biovest Nuaille, Frankreich
Lewis Lung carcinoma-Zellen	LLC1	American Type Culture Collect. Manassas, VA, USA
Natriumchloridlösung 0,9 % zur intravenösen Injektion	Isotonische Natriumchlorid- lösung Diaco [®]	Serag-Wiessner KG Naila, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Gibco [®] Penicillin 10.000 U/ml Streptomycin 10 mg/ml	Life Technologies GmbH Darmstadt, Deutschland
Trypsin 10X	Trypsin/EDTA 10X	PAN-Biotech GmbH Aidenbach, Deutschland
Zellkulturmedium	RPML-1640 mit L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH Pasching, Austria

2.1.4.3 Systeme und Geräte

Tabelle 2.5: Übersicht der verwendeten Systeme und Geräte für Zellkultur

Artikel	Handelsname	Hersteller
Absaugsystem	Vacusaft comfort	Integra Biosciences AG Zizers, Schweiz
Bench	Model NO. NU-480-400E	NuAire Plymouth, MN, USA
Brutschrank	Heracell 150	Thermo Scientific Waltham, MA, USA
Einkanalphipetten	Eppendorf Research [®] adjustable	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Handzähler	Handstückzähler Chrom	IMPACT systems GmbH Köln, Deutschland
Inverses Labormikroskop	DM IL	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Vortexer	VWR Lab Dancer Mini Vortexer	VWR International GmbH Darmstadt, Deutschland
Wasserbad	WNB-14	Memmert GmbH & CO.KG Schwabach, Deutschland
Zählkammer	Zählkammer (Neubauer) ohne Federklemmen	P. Marienfeld GmbH & CO.KG Lauda-Königshofen, D
Zentrifuge	Rotina 420R	A. Hettich GmbH & Co.KG Tuttlngen, Deutschland

2.1.5 Material und Geräte für Tierexperimente

2.1.5.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.6: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien für Tierexperimente

Artikel	Handelsname	Hersteller
Augensalbe	Bepanthen [®] Augen- und Nasensalbe	Bayer Vital Leverkusen, Deutschland
Dreiwegehahn	Discofix [®] C-3	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Einbettkassetten, groß	Rotilabo [®] Einbettkassette Macro	Carl Roth GmbH & Co Karlsruhe, Deutschland
Einbettkassetten, klein	Tissue Tek [®] 3 Uni-Cassette [®]	Sakura Finetek Europe B.V Alphen aan den Reijn, NL
Einmalhandschuhe	Vasco [®] Nitril white	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Einmalnitrilhandschuhe	Peha soft [®] nitrile	Paul Hartmann AG Heidenheim, Deutschland

Einmalspritze 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml	Inject® Luer Solo	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Einmalspritze 50 ml	Original Perfusor® Spritze	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Enthaarungscreme	Elca® Med Creme	ASID BONZ Herrenberg, Deutschland
Falconröhrchen 50 ml, 15 ml	Cellstar® Tubes	Greiner Bio-One GmbH Frickenhäusen, Deutschland
Hämatokritkapillaren	100 Haematokrit-Kapillaren 75 mm/60 µl Na-Heparin	Hirschmann Laborgeräte GmbH Eberstadt, Deutschland
Kanülen	BD Microlance 3®	Becton Dickinson Franklin Lakes, NJ, USA
Medizinisches Klebeband	Durapore®	3M St. Paul, MN, USA
Objektträger	50 Objektträger	R. Langenbrinck Emmendingen, Deutschland
Perfusor-Leitung 150 cm		B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
PET-Schläuche	Variable Durchmesser	
Polyester Garn	5/10 GRN Polyester 1000YDS Waxed 49-AD-2	Ashaway Welwyn Garden City Herts, GB
Skalpel 10er, 11er, 20er	Feather® Disposal Scalpel	Pfm medical AG Köln, Deutschland
Spülspritze	Original 50ml Perfusor®- Spritze	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Tube (1,5 ml)	Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt AG & Ko Nümbrecht, Deutschland
Tupfer	Schlinggazetupfer®	Fuhrmann GmbH Much, Deutschland
Ultraschallgel	Aquagel®	Parker Laboratories Inc. Fairfield, USA
Venenverweilkanüle 20 G (1,1 mm x 33 mm)	Vasofix® Safety	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Verlängerungsschlauch	Prolonsend®	Sendal Almaraz, Spanien
Verschlussfolie	Parafilm "M"®	American National Can Menasha, Wisconsin, USA
Xylocaingel 2 %	Xylocain® Gel 2 % Lidocainhydrochlorid	Astra Zeneca GmbH Wedel, Deutschland
Zellstofftupfer 4 x 5 cm	Pur-Zellin®	Paul Hartmann AG Heidenheim, Deutschland
Zellulose-Handtücher	Tork® Universal	Tork Mannheim, Deutschland

2.1.5.2 Injektionslösungen und Substanzen

Tabelle 2.7: Übersicht der verwendeten Injektionslösungen und Substanzen für Tierexperimente

Artikel	Handelsname	Hersteller
50 % 2-Propanol / 1 % Povidon-Jod-Lösung	Braunoderm®	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Buprenorphin	Temgesic®	Essex Pharma München, Deutschland
Formaldehyd 3,5-3,7 %	Formaldehyd 3,5-3,7 % Neutral gepuffert Mit Methanol stabilisiert	Otto Fischar GmbH & CO.KG Saarbrücken, Deutschland
Heparin 25000 I.E.	Heparin-Natrium-25000- ratiopharm®	Ratiopharm GmbH Ulm, Deutschland
Ketaminhydrochlorid 100 mg/ml	Ketamin 10 %®	Belapharm GmbH & CO. KG Vechta, Deutschland
Natriumchloridlösung 0,9 % zur intravenösen Injektion	Isotonische Natriumchlorid- lösung Diaco®	Serag-Wiessner KG Naila, Deutschland
Natriumchloridlösung 0,9 % zum Spülen und Befeuchten	NaCl 0,9 %®	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Xylazinhydrochlorid 2 %	XYLAZIN 2 %®	CEVA Tiergesundheit GmbH Düsseldorf, Deutschland

2.1.5.3 Systeme und Geräte

Tabelle 2.8: Übersicht der verwendeten Systeme und Geräte für Tierexperimente

Artikel	Handelsname	Hersteller
Beatmungspumpe	MiniVent Type 845	Hugo Sachs Elektronik March, Deutschland
Blutanalysegerät	Rapidlab™ 348	Siemens Healthcare Diagnostics Inc. Tarrytown, NY, USA
Computer mit Monitor		
Doppelmuffen des Stativs	Rotilabo® - Doppelmuffen	Carl Roth GmbH & CO. KG Karlsruhe, Deutschland
Druckaufnehmer	APT 300	Hugo Sachs Elektronik Hugstetten, Deutschland
Druckwandler	Combitrans Monitoring Set Mod. II for arterial Blood Pressure Measurement	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
EKG Tisch	Vevo 770	VisualSonics Inc. Toronto, Ontario, Kanada
Feinwaage	Mettler Toledo PB303 Delta Range®	Mettler Toledo Greifensee, Schweiz

Isofluranverdampfer	Vet Equip	KF Technology Rom, Italien
Kaltlichtquelle	Schott KL200	Schott AG Mainz, Deutschland
Katheter für <i>A. carotis communis</i>	Micro Cannulation System	FST GmbH Heidelberg, Deutschland
Katheter für <i>V. jugularis externa</i>	Hyman Mouse Pressure Catheter 14 cm	Nu MED Inc. Hopkinton, USA
Klemmen zur Fixierung von Spülspritzen am Stativ	Rotilabo® - Dreifinger-Klemmen	Carl Roth GmbH & CO. KG Karlsruhe, Deutschland
Operationsbesteck		Fine science tools GmbH Heidelberg, Deutschland Martin Medizintechnik Tuttlingen, Deutschland
Rektalthermometer		Indus Instruments Houston, Texas
Software von HSE	HSE-BDAS BP	Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH March, Deutschland
Stativplatte	Rotilabo® - Stativplatte	Carl Roth GmbH & CO. KG Karlsruhe, Deutschland
Stativstab	Rotilabo® - Stativstab	Carl Roth GmbH & CO. KG Karlsruhe, Deutschland
Tierwaage	Medion Küchenwaage MD11622	Medion AG Essen, Deutschland
Trachealtubus	Gefertigt aus Vasofix® Safety 20G gekürzt auf ca. 1,5 cm	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Ultraschallgerät	Vevo 770	VisualSonics Inc. Toronto, Ontario, Kanada
Vergrößerungslupe	MS5	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Wasserbadunterlage		Keutz Labortechnik Reiskirchen, Deutschland

2.1.6 Material und Geräte für Histologie

2.1.6.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.9: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien für Histologie

Artikel	Handelsname	Hersteller
Deckgläser 24 x 36 mm		R. Langenbrinck Emmendingen, Deutschland
Eindeckmedium Xylol-löslich	Pertex®	Medite GmbH Burgdorf, Deutschland
Mikrotomklingen	Microtome Blade A35	Feather Safety Razor CO., LTD., Osaka, Japan
Objektträger	Superfrost Ultra Plus®	R. Langenbrinck Emmendingen, Deutschland
Paraffin Einbettmedium	Paraplast Plus®	Sigma Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
Pipettenspitzen		Sarstadt AG & Co. Nümbrecht, Deutschland
Selecta Faltenfilter		Schleicher + Schüll GmbH Dassel, Deutschland
Stift für Immunhistochemie	PAP Pen	Kisker Biotech GmbH & CO. KG, Steinfurt, Deutschland

2.1.6.2 Lösungen, Kits und Antikörper

Tabelle 2.10: Übersicht der verwendeten Lösungen, Kits und Antikörper für Histologie

Artikel	Handelsname	Hersteller
Anti-alpha-smooth muscle-actin, Clone 1A4, monoklonal aus Maus	Verdünnung 1:900 mit 10 % BSA	Sigma Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
Anti-CD209, Clone DZN46, monoklonal, aus Maus	Verdünnung 1:10 Mit Antibody Diluent	BD Pharmingen San Diego, CA, USA
Anti-CD3, polyklonal, aus Kaninchen	Human: Verdünnung 1:150 Maus: Verdünnung 1:400 Mit Antibody Diluent	Biocare Medical, LLC. Concord, CA, USA
Anti-CD68, Clone KP1 monoklonal, aus Maus	Verdünnung 1:100 Mit Antibody Diluent	Calbiochem (EMD Millipore) Darmstadt, Deutschland
Antikörperversdünner	Antibody Diluent ready-to-use	Zytomed Systems GmbH Berlin, Germany
Anti-von Willebrand Faktor, polyklonal, aus Kaninchen	Verdünnung 1:1200 mit 10 % BSA	Dako Deutschland GmbH Hamburg, Deutschland
Bovines Serum-Albumin	Albumin bovine Fraction V	Serva Electrophoresis GmbH Heidelberg, Deutschland

DAB-Substrat	Vector® DAB Substrate Kit	Vector Laboratories Burlingame, CA, USA
Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat, pro analysi $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Eisen-Haematoxylin A nach Weigert enthält Ethanol		Waldeck GmbH & CO. KG Münster, Deutschland
Eisen-Haematoxylin B nach Weigert		Waldeck GmbH & CO. KG Münster, Deutschland
Eosin-y-alkoholisch	Shandon Eosin Y alcoholic	Richard-Allan Scientific Kalamazoo, MI, USA
Essigsäure 100 %	Rotipuran® 100 %	Carl Roth GmbH & CO. KG Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 70 %	Ethanol S 70 % EU VG SAV	SAV LP GmbH Flintsbach, Deutschland
Ethanol 96 %	Ethanol 96 % (V/V)	Otto Fischar GmbH & CO. KG Saarbrücken, Deutschland
Ethanol 99,6 %	UN 1170 Ethanol 3, II, ADR	Alkoholhandel GmbH & CO. KG Ludwigshafen, Deutschland
Formaldehyd 3,5-3,7 %	Formaldehyd 3,5-3,7 % Neutral gepuffert Mit Methanol stabilisiert	Otto Fischar GmbH & CO. KG Saarbrücken, Deutschland
Hämalaun	Hämalaun nach Mayer, sauer	Waldeck GmbH & CO. KG Münster, Deutschland
Hämatoxylin	Hematoxylin Solution ready-to-use	Invitrogen Corporation Frederick, MD, USA
ImmPRESS Reagent Kit Anti-Rabbit Ig		Vector Laboratories Burlingame, CA, USA
ImmPRESS Reagent Kit Anti-Mouse Ig		Vector Laboratories Burlingame, CA, USA
Isopropanol (99,8 %)	2-Propanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
Kaliumchlorid	Kaliumchlorid KCl	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Kaliumdihydrogenphosphat pro analysi KH_2PO_4	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Methanol		Sigma Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
Methylgrün		Vector Laboratories Burlingame, CA, USA
Natriumazid	Riedel-de Haën Natriumazid	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH Seelze, Deutschland

Natriumchlorid	Natriumchlorid pro analysi NaCl	Sigma Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
NovaRED-Substrat	Vector® Nova RED Substrate Kit	Vector Laboratories Burlingame, CA, USA
Pikrinsäure, wässrig, gesättigt	Pikrinsäure-Lösung 1,2 % Bio-Chemica	Appli Chem GmbH Darmstadt, Deutschland
Proteinase K	Dako RealTM	Dako Denmark A/S Glostrup, Denmark
R.T.U. Horseradish		Vector Laboratories Burlingame, CA, USA
Resorcin Fuchsin nach Weigert		Waldeck GmbH & CO. KG Münster, Deutschland
Salzsäure 25 %	Salzsäure 25 %, reinst	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Säurefuchsin		Sigma Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
Sirius Rot F3B Lösung		Niepötter Labortechnik Bürstadt, Deutschland
Trypsin	Digest All 2®	Invitrogen Corporation Frederick, MD, USA
Universal Quick Kit	R.T.U. Vectastain® Kit	Vector Laboratories Burlingame, CA, USA
VIP-Substrat	Vector VIP® Substrate Kit	Vector Laboratories Burlingame, CA, USA
Wasserstoffperoxid	Wasserstoffperoxid 30 % pro analysi	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Xylol		Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Zitratpuffer 20X	Citrate Buffer pH 6,0 10X Concentrate	Invitrogen Corporation Frederick, MD, USA
Zytomed System Rodent Block M und MM HRP Polymer	MM HRP-Polymer Kit Mouse antibodies on Mouse Tissues	Biocare Medical, LLC. Concord, CA, USA

2.1.6.3 Systeme und Geräte**Tabelle 2.11: Übersicht der verwendeten Systeme und Geräte für Histologie**

Artikel	Handelsname	Hersteller
Computer	Dell Precision T3500	Dell GmbH Frankfurt am Main, Deutschland
Digitale Kamera	DFC 310FX	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Einkanalpipetten	Pipetman Neo	Gilson, Inc. Middleton, WI, USA
geschlossener Vakuum- Gewebeinfiltrationsautomat	ASP 300S	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Kühlplatte	EG 1150C	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Makro für - Muskularisierungsgrad - Wandstärke - Kollagengehalt		entwickelt von Hr. Christoph Frank (Informatiker), Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Objektträgerstrecktisch	HI 1220	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Paraffinausgießstation	EG 1140H	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Paraffinstreckbad	HI 1210	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Rotationsmikrotom vollautomatisch	RM 2255	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Software	Q Win V3	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Stereomikroskop Durchlicht	DM 6000B	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Wärmeschrank		Memmert GmbH & Co KG Schwabach, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Kultur von Lewis Lung Carcinoma 1-Zellen

Während in mehrzelligen Organismen die Zufuhr von Nährstoffen, sowie die Entsorgung von Stoffwechselendprodukten über ein verzweigtes, leistungsfähiges Blutgefäßsystem gewährleistet wird, muss in der Zellkultur das Zellkulturmedium diese Rolle übernehmen. Jedoch ist der Nährstoffgehalt des Mediums mit wachsender Zellzahl begrenzt, so dass, in regelmäßigen Abständen, das Zellkulturmedium erneuert werden muss. Zudem sammeln sich vermehrt toxische Stoffwechselendprodukte im Medium an, was eine Verschiebung des pH-Wertes in den sauren Bereich und einen Farbumschlag des Phenolrots des Mediums von rot nach gelb bewirkt. Außerdem erlaubt der Mediumwechsel, in Kombination mit dem Passagieren von Zellen, Tochterkolonien zu subkultivieren, indem die Zellen in verdünnter Form (1:2 bis 1:10) in eine neue Zellkulturflasche mit frischem Nährmedium überführt werden um sich dort zu vermehren.

2.2.1.1 Subkultivierung und Trypsinierung

LLC1-Zellen wurden von der American Type Culture Collection erworben und in sterilen Gewebekulturflaschen in einem Brutschrank mit 5 % CO₂ bei 37°C und einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre kultiviert. Als Zellkulturmedium wurde ein RPMI-1640 Medium mit 10 % fetales Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin (10.000 U/ml Stammlösung) und Streptomycin (10 mg/ml Stammlösung) verwendet.

Für die Zellkultur von Lewis Lung Carcinoma-Zellen war es beim Mediumwechsel nötig, die konfluenten, adhärent wachsenden Tumorzellen mittels einer 1X Trypsin-Lösung, hergestellt aus Trypsin/Ethylendiamintetraacetat (EDTA) 10X und Dulbecco's phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), vom Flaschenboden zu lösen. Dazu wurde zunächst der Überstand einer Zellkulturflasche (75 cm²) abpipettiert und in einem 50 ml Tube aufgefangen. Anschließend wurden, zur Auflösung des verbliebenen Zellrasens, 5 ml der 1X Trypsin-Lösung zu den adhärenen LLC1

des Flaschenbodens gegeben und für ca. 1 Minute bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Durch die ausgeprägte Substratspezifität des Trypsins Lysin-, Arginin- und Cysteinbindungen zu spalten, wurden gezielt Proteine, die den Zellverband bilden, abgebaut. Das EDTA komplexierte als Chelatbildner Ca^{2+} -Ionen der Membranproteine, wodurch zusätzlich Zellanhebungsstrukturen aufgeweicht wurden. Es musste darauf geachtet werden, das Trypsin nicht zu lang einwirken zu lassen, da die proteolytische Wirkung in dem Fall nicht mehr nur auf die extrazellulären Proteine, die den Zellverband aufrechterhalten, beschränkt bleiben würde, was zum Absterben der Zellen hätte führen können. Nach der 1-minütigen Inkubationszeit wurde das Trypsin nach mehrmaligem Spülen mit den darin suspendierten LLC1-Zellen zu 1 ml FCS pipettiert, ebenso wie 10 ml Dulbecco's PBS zum Nachspülen der Zellkulturflasche. FCS bewirkte durch seinen hohen Proteinanteil eine Inaktivierung des Trypsins, sowie z.T. eine Bindung des zytotoxischen EDTAs. Als nächstes folgte der Zentrifugationsschritt des LLC1/Trypsin/FCS/PBS-Gemischs zusammen mit dem bereits zu Beginn abpipettierten Überstand für 8 Minuten bei 1600 Umdrehungen pro Minute (UpM). Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in 10 ml RPMI-1640 Medium mit 10 % FCS und 1 % Penicillin (10.000 U/ml Stammlösung) und Streptomycin (10 mg/ml Stammlösung) resuspendiert, auf diverse Zellkulturflaschen (75 cm²) aliquotiert und anschließend mit Zellkulturmedium auf 20 ml pro Zellkulturflasche aufgefüllt. Generell wurden die Zellen auf diese Weise 1:4 gesplittet, so dass nach 2 Tagen die Subkultivierung erneut durchgeführt werden musste.

2.2.1.2 Kryokonservierung

Zum Schutz vor Verlust der Zelllinie durch Kontaminationen und zur Erstellung eines Vorrats an LLC1-Zellen, wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff bei -196°C überführt, wodurch sie jahrelang haltbar gemacht wurden.

Dazu wurde, ebenso wie beim Splitten, der Überstand der Zellkulturflasche mit konfluent wachsenden Zellen abpipettiert und zusammen mit den durch das Trypsin gelösten Zellen während 8 Minuten bei 1600 UpM zentrifugiert. Nach

Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in eiskaltem Einfriermedium aus 50 % RPMI-1640, 37,5 % FCS und 12,5 % DMSO resuspendiert und Zellportionen von etwa 5×10^6 Zellen pro 1 ml Einfriermedium in Kryoröhrchen aliquotiert. DMSO sollte dabei, als Gefrierschutzmittel, die Zellen vor der irreversiblen Zerstörung durch Kristallbildung schützen. Das Abkühlen der Kryoröhrchen musste, zum weiteren Schutz der Zellwände vor Kristallbildung, so langsam wie möglich vonstattengehen und die Röhrchen schrittweise von -20°C (1 Tag) über -80°C (2 Tage) zu -130°C abgekühlt werden. Dieses Vorgehen gewährleistete eine langsame und kontinuierliche Abkühlung von 1°C pro Stunde. Die Zellen verblieben entweder bei -130°C in der Tiefkühltruhe oder wurden in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.1.3 Revitalisierung

So langsam wie das Abkühlen bei Kryokonservierung durchgeführt werden musste, so schnell verlief der Auftau- oder Revitalisierungsschritt, um die zytotoxische Wirkung des DMSO zu verringern. Dabei entnahm man dem Stickstoffcontainer ein Vial und erwärmte dieses entweder während 5 Minuten auf Eis oder kurz im Wasserbad bei 39°C.

Anschließend wurde der Inhalt des Kryoröhrchens in 40 ml RPMI-1640 Medium mit 10 % FCS und 1 % Penicillin (10.000 U/ml Stammlösung) und Streptomycin (10 mg/ml Stammlösung) überführt und bei 1600 UpM während 8 Minuten zentrifugiert. Schließlich wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 20 ml RPMI-1640 Medium mit 10 % FCS und 1 % Penicillin (10.000 U/ml Stammlösung) und Streptomycin (10 mg/ml Stammlösung) resuspendiert.

2.2.2 Intravenöse Applikation von LLC1-Zellen in die laterale Schwanzvene

2.2.2.1 Vorbereitung der LLC1-Zellsuspension

Das Verfahren der Schwanzveneninjektion von LLC1-Tumorzellen führt zu dem Bild eines metastatischen Modells, bei dem sich Tumorzellen aus dem Blutgefäßsystem im nächstgelegenen Kapillarbett der Lunge festsetzen, um den Primärtumor zu bilden. Dies sollte im ersten durchgeführten Tierexperiment von Nutzen sein, um bei C57BL/6N-Mäuse Adenokarzinome in der Lunge hervorzurufen. Als Kontrollen dienten C57BL/6N-Tiere, deren intravenöse Injektion aus 100 µl NaCl 0,9 % bestand.

Bei der Vorbereitung der Zellen für diesen Eingriff, musste zunächst die Anzahl der benötigten Zellkulturflaschen mit konfluenten LLC1-Zellen berücksichtigt werden. Man bedenke, dass eine Flasche (75 cm²) etwa 5-10 Millionen LLC1-Zellen beinhaltet und jede Maus eine intravenöse Injektion von 1 Million Zellen erhalten soll. Anschließend wurde wie bei der Subkultivierung vorgegangen, d.h. bis zum Schritt der Zentrifugation bei 1600 UpM während 8 Minuten. Nach dem Absaugen der Überstände werden die Zellpellets in 10 ml Dulbecco's PBS erneut suspendiert und mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer anhand folgenden Verfahrens ausgezählt:

Zunächst wurde das Deckglas mit leichtem Druck im Querformat auf die Trägerstäbe der Neubauer Zählkammer aufgeschoben, so dass die Newton'schen Interferenzfarben im Bereich der Auflagefläche sichtbar wurden. Dann wurde die zu bestimmende LLC1-Zellsuspension seitlich aufpipettiert und durch die Kapillarkräfte in den Zwischenraum zwischen Deckglas und Grundplatte gezogen. Anhand des inversen Labormikroskops wurden daraufhin unter 100-facher Vergrößerung, bei geschlossener Blende, die Zellen innerhalb von 4 großen Eckquadraten mit einer Fläche von je 1 mm² ausgezählt. Diese Eckquadrate befinden sich in einem der beiden eingravierten Zählnetze, welche durch eine Nut voneinander getrennt sind. Diese Zellzahl wurde dann durch 4 geteilt, um den

Mittelwert pro Großquadrat zu erhalten. Anschließend wurde die folgende Formel verwendet:

$$Y = (X / 0,1) * 10.000,$$

wobei „Y“ die Anzahl der LLC1-Zellen in 10 ml Lösung, „X“ die Anzahl der gezählten LLC1-Zellen pro Großquadrat, „0,1“ das Volumen eines Eckquadrats mit einer Fläche von 1 mm² und einer Tiefe von 0,01 mm und „10.000“ den Faktor zum Wechsel des Volumens, das die Zellen enthält, von 1 µl auf 10 ml darstellen. War die Anzahl der Zellen in den 10 ml PBS bestimmt, erfolgte erneut ein Abzentrifugieren bei 1600 UpM während 8 Minuten. Schließlich wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in dem gewünschten Volumen an 0,9 %er NaCl-Lösung zur intravenösen Injektion gelöst, so dass eine Konzentration von 1 Million LLC1-Zellen pro 100 µl NaCl 0,9 % erreicht werden konnte.

2.2.2.2 Intravenöse Injektion in die laterale Schwanzvene

Zur Injektion der LLC1-Zellsuspension wurden C57BL/6N-Mäuse (männlich, 20-22g) mit Hilfe einer Kombination aus Ketaminhydrochlorid 10 % (60 mg/kg) und Xylazin 2 % (5 mg/kg) durch intraperitoneale Injektion narkotisiert.

Anschließend wurde der Schwanz zum besseren Hervortreten der lateralen Schwanzvenen erwärmt, desinfiziert und mittels eines selbst konstruierten Venenkatheters punktiert, so dass 1 Million Tumorzellen in 100 µl NaCl 0,9 % intravenös verabreicht werden konnten. Die C57BL/6N-Kontrolltiere erhielten das identische Volumen an reinem NaCl 0,9 % i.v.. Bis zum Wiedererlangen aller Reflexe wurden die Tiere unter dem wärmenden Licht einer Rotlichtlampe beobachtet.

2.2.3 Echokardiographie

Die echokardiographischen Untersuchungen wurden von Hr. Dr. Bakytbek Kojonazarov durchgeführt.

Der transthorakale Ultraschall wird heute als der goldene Standard zur nicht-invasiven Beurteilung des Herz-Kreislaufsystems angesehen. In der Forschung stellt die Echokardiographie eine ebenso etablierte Methode dar, die es ermöglicht eine Aussage bezüglich der kardiovaskulären Situation an pulmonaler Hypertonie erkrankter Mäuse zu treffen (Thibault *et al.*, 2010; Pullamsetti *et al.*, 2012).

Die Echokardiographie dient dazu, Herzgröße und -funktion zu beurteilen. Sie bietet eine valide, nicht-invasive Möglichkeit reproduzierbare Werte zu erlangen und die zeitlichen, morphologischen und funktionellen Veränderungen des Herzens zu untersuchen. Die Methode ist standardisiert, ohne großen Aufwand verfügbar und relativ schnell durchführbar.

2.2.3.1 Aufteilung der Tiergruppen

LLC1-Lungentumor-Modell

- C57BL/6N-Mäuse nach intravenöser Injektion von 1 Million LLC1-Zellen in 100 µl NaCl 0,9 % in die laterale Schwanzvene; männlich (n=10)
- C57BL/6N-Mäuse zur intravenösen Injektion von 100 µl NaCl 0,9 % in die laterale Schwanzvene; als gesunde Kontrollen; männlich (n=10)

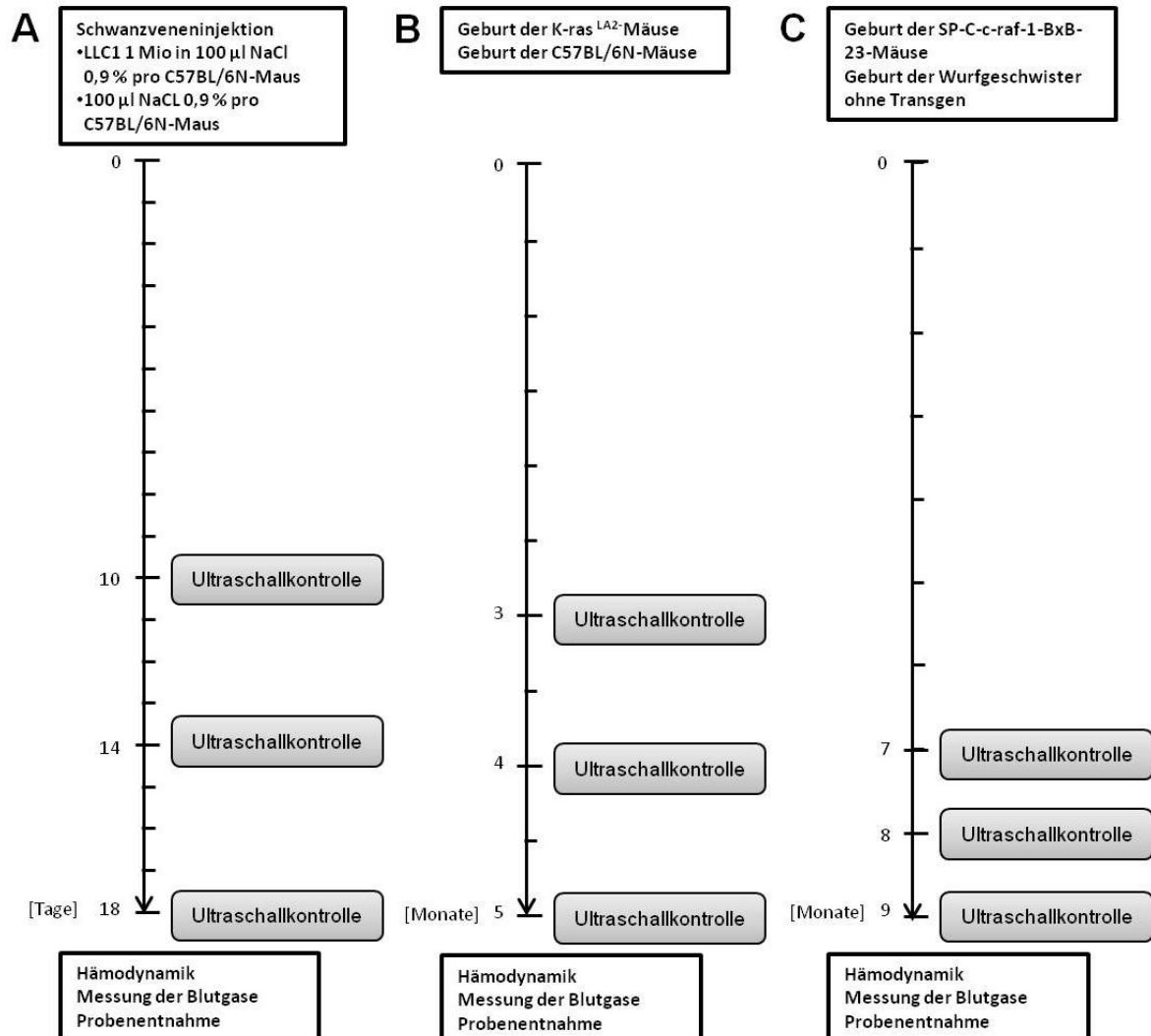
K-ras^{LA2}-Lungentumor-Modell

- K-ras^{LA2}; männlich und weiblich (n=10)
- C57BL/6N; als gesunde Kontrollen; männlich (n=10)

SP-C-c-raf-1-BxB-23-Lungentumor-Modell

- SP-C-c-raf-1-BxB-23; männlich und weiblich (n=10)
- Negative Wurfgeschwister; als gesunde Kontrollen; männlich und weiblich (n=5)

2.2.3.2 Zeitpunkt der echokardiographischen Untersuchungen

**Abbildung 2.1: Echokardiographische Verlaufskontrollen in den 3 Tierversuchen**

(A) LLC1-Lungentumormodell. (B) K-ras^{LA2}-Lungentumormodell. (C) SP-C-c-raf-1-BxB-23-Lungentumormodell.

Nach Beginn der Studien (Schwanzveneninjektion, bzw. Geburt der genetisch modifizierten Tiere) und dem damit verbundenen Beginn der Proliferation der Lungentumoren wurden die Mäuse unter identischen Bedingungen in isoliert ventilierten Käfigen gehalten. Wie in Abb. 2.1 zu sehen, erfolgten je nach Modell an unterschiedlichen Zeitpunkten jeweils 3 echokardiographische Verlaufs-

kontrollen zur Beurteilung des Effekts der Lungentumoren auf die kardiovaskuläre Situation der Mäuse.

LLC1-Lungentumor-Modell

Bei den C57BL/6N-Mäusen, welche eine intravenöse Injektion von LLC1-Zellen bzw. NaCl 0,9 % in die laterale Schwanzvene erhielten, wurde die Versuchsdauer auf 18 Tage festgelegt, da es sich bei diesem Modell um ein rasch fortschreitendes und in unserer Arbeitsgruppe gut etabliertes Versuchsmodell handelt. Die echokardiographischen Untersuchungen fanden an den Tagen 10, 14 und 18 statt, bevor die Tiere anschließend der hämodynamischen Messung unterzogen wurden.

K-ras^{LA2}-Lungentumor-Modell

Für dieses Teilprojekt wurde eine Versuchsdauer von 5 Monaten ausgewählt, so dass die Ultraschallkontrollen in regelmäßigen Abständen nach 3, 4 und 5 Monaten stattfinden konnten. Danach wurden die K-ras^{LA2} zusammen mit ihren C57BL/6N-Kontrolltieren in dem *in vivo*-Modell zur Erfassung der hämodynamischen Parameter untersucht.

SP-C-c-raf-1-BxB-23-Lungentumor-Modell

Sowohl die für dieses Transgen positiven Tiere als auch deren negative Wurfgeschwister wurden über einen Zeitraum von 9 Monaten drei Mal echokardiographisch untersucht. Dies erfolgte nach 7, 8 und 9 Monaten und endete dann unter Narkose mit der Messung der Hämodynamik und der Blutgase mit entsprechender Probenentnahme.

2.2.3.3 Echokardiographische Verlaufskontrolle und erhobene Parameter

Während der Ultraschallkontrolle erhielten die Mäuse eine Inhalationsnarkose mit Isofluran. Die Narkoseeinleitung erfolgte in einer Induktionsbox während einer 2-minütigen Anflutungsphase eines 3 % Isofluran/Sauerstoff-Gemisches. Dann wurde die Maus behutsam in Rückenlage auf einer Wärmeplatte mit integrierten Elektrokardiogramm-Elektrodenplättchen mit Hilfe von Klebestreifen immobilisiert und sofort über einen Nasenkonus mit einem Gemisch aus 1,5 % Isofluran/Sauerstoff-Gemisch beatmet, um über die gesamte Dauer der Ultraschalluntersuchung die Anästhesie aufrechtzuerhalten.

Als nächster Schritt wurde ein mit Gleitgel befeuchteter Temperaturmessfühler rektal eingeführt, welcher es ermöglichte die Temperatur der Wärmeplatte automatisch der Körpertemperatur der Maus anzupassen. Gegebenenfalls wurde das Versuchstier zusätzlich mit Rotlicht bestrahlt, um zu verhindern, dass das narkotisierte Tier während der Untersuchung auskühlt. Das abgeleitete Ein-Kanal-EKG und die Messung der Körpertemperatur erlaubten es also von Beginn an die Vitalparameter der Maus zu kontrollieren und ggf. auf Veränderungen zu reagieren.

Da Mäuse in Narkose keinen Lidschlussreflex zeigen, wurden die Augen zum Schutz vor Austrocknung mit Augencreme bedeckt. Zudem mussten die Haare an Thorax und kranialem Abdomen mittels Rasur und Applikation von Enthaarungscreme zur besseren Ankopplung des Schallkopfs und Verhinderung von Artefakten entfernt werden. Zum gleichen Zweck wurde anschließend ausreichend angewärmtes Ultraschallgel auf die enthaarten Bereiche aufgetragen. Das verwendete Vevo770 Doppler-Eckokardiographiesystem von VisualSonics wurde mit einem 30 MHz Doppler- und 30 MHz 2D-Linearschallkopf betrieben. Das Gerät verfügt über eine Software, die eine Bildspeicherung mit hoher Bildfrequenz ermöglicht. Im M-Mode und Doppler-Verfahren wurden daraufhin die erforderlichen Parameter, wie Herzminutenvolumen, rechtsventrikulärer Innendurchmesser, isovolumetrische Relaxationszeit, systolische Abweichung des Trikuspidalanulus und myokardialer Leistungsindex erhoben.

Schließlich wurde die Maus aus der Fixation gelöst, vollständig gesäubert, bis zum Wiedererlangen des Bewusstseins beobachtet und anschließend in ihrem Käfig in den Tierstall gebracht.

Cardiac Output (CO)

Um eine Aussage über die Pumpfunktion des gesamten Herzens treffen zu können, machte man sich das Herzminutenvolumen zu eigen, welches das Blutvolumen widerspiegelt, das in einer Minute vom Herzen über die Aorta in den Körperkreislauf gepumpt wird [ml/min]. Es errechnet sich aus Schlagvolumen \times Herzfrequenz (HF). Da diese Parameter durch die Ultraschalluntersuchung nicht direkt zu erfassen sind, errechnet sich das Herzminutenvolumen anhand folgender Formel: $HMV = \pi \times LVOT^2/4 \times VTI \times HF$.

Dabei stellt LVOT den linksventrikulären Ausflusstrakt dar, dessen Durchmesser im 2D-Bild gemessen wird. Daraus wird eine Fläche mit Hilfe der Kreisfläche berechnet und mit der Umfahrung der Pulse-wave-Kurve im LVOT, dem Integral der systolischen Strömungsgeschwindigkeit innerhalb der Aorta (Velocity Time Integral, VTI), sowie der Herzfrequenz (HF) multipliziert.

Right Ventricular Internal Diameter (RVID)

Als Maß für die Dilatation des rechten Ventrikels gibt der RVID den inneren Durchmesser des rechten Ventrikels während der Diastole an [mm]. Im apikalen 4-Kammerblick repräsentiert er den maximalen Abstand der freien Wand des rechten Ventrikels zum Septum.

Isovolumic Relaxation Time (RV IVRT/RR)

Die isovolumetrische Relaxationszeit des rechten Ventrikels reflektiert die Zeitspanne zwischen Ende des systolischen Blutflusses in die Pulmonalarterie (Schluss der Pulmonalklappe) und Beginn des Blutflusses durch die Trikuspidalklappe [%]. Gemessen wurde während eines Herzzyklusses, wobei RR die Zeitspanne darstellt von einer R-Zacke bis zur nächsten im Ein-Kanal-EKG. Sie ist ein Maß für die Relaxation und somit die diastolische Funktion des rechten Ventrikels.

Tricuspid Annular Plane Systolic Excursion (TAPSE)

Die TAPSE wurde mittels M-Mode im 4-Kammerblick gemessen und entspricht der Distanz der Bewegung des Trikuspidalanulus von der Enddiastole bis zur Endsystole [mm]. Daher wird die TAPSE oft zur Beurteilung der systolischen, rechtsventrikulären Kontraktionsfähigkeit verwendet.

Myocardial Performance Index

Als Maß zur Bewertung der globalen Funktion des Herzens (systolisch und diastolisch), wurde der mit dem Tissue Doppler Imaging erfasste myokardiale Leistungsindex gemessen, der sich errechnet aus dem Quotienten der isovolumetrischen Kontraktionszeit plus isovolumetrischer Relaxationszeit und der gesamten Ejektionszeit der rechten Kammer (Abb. 2.2).

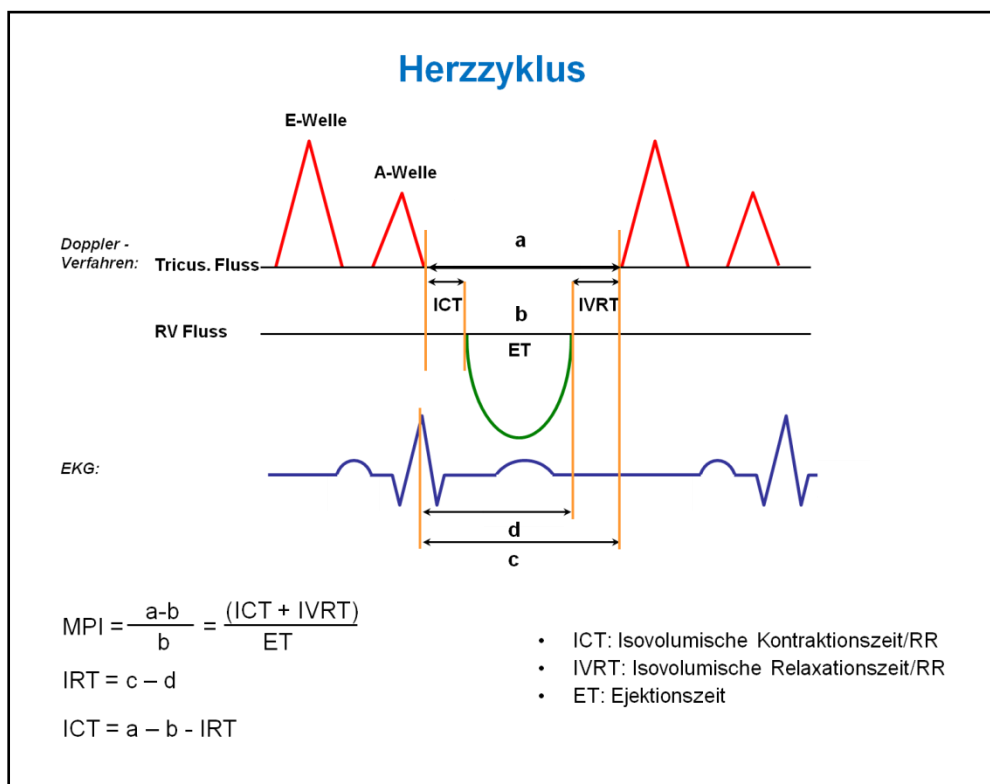


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des Herzzyklusses

Sie beschreibt die Erfassung der isovolumetrischen Kontraktions- (ICT) und Relaxationszeit (IVRT), sowie der Ejektionszeit (ET) des rechten Ventrikels und die Ermittlung des Myocardial Performance Index (nach Vonk et al., 2007).

2.2.4 Häodynamische Messung am Ganztier

2.2.4.1 Vorbereitung und Narkose

Um die Bildung von Blutkoagel zu unterbinden, die während des chirurgischen Eingriffs und der Implantation der Katheter letztere zulegen könnten, wurde zunächst eine verdünnte Heparin-Lösung (1:10) hergestellt. Dazu wurden in einer 1 ml-Spritze 100 µl Heparin und 900 µl NaCl 0,9 % vermengt und 20 Minuten vor Applikation der Narkose 100 µl dieses homogenen Gemischs pro 20 g Maus i.p. injiziert. Dies entspricht einer Dosis von 50 I.E. pro 20 g Maus. Die antikoagulatorische Wirkung von Heparin beruht darauf, dass es in die Gerinnungskaskade eingreift, indem es an im Blut zirkulierende Antithrombine, v.a. Antithrombin III, bindet und die von ihm katalysierte Reaktion beschleunigt (Opal *et al.*, 2002). Somit werden aktivierte Gerinnungsfaktoren, wie Thrombin und Faktor Xa gehemmt (Lüllmann *et al.*, 2010).

In den anschließenden 20 Minuten Wartezeit, bis zur vollständigen Resorption und Wirkungseintritt des Heparins, wurden sämtliche Druckaufnehmer, Schläuche und Katheter des Messsystems mit NaCl 0,9 % gespült, um etwaige Luftblasen zu entfernen. Die Software HSE-BDAS BP zur Aufzeichnung des systemisch arteriellen Druckes (SAP) und systolischen rechtsventrikulären Blutdruckes (RVSP) wurde ebenfalls gestartet und der Ausgangswert für den SAP und RVSP durch Einstellung am Druckwandler auf 0 mmHg gesetzt. RVSP unterscheidet sich bei intakter Pulmonalklappe nicht vom systolischen pulmonalarteriellen Druck (Rosenkranz *et al.*, 2011).

Anschließend musste eine Kombination aus sich ergänzenden und auf die physiologischen Bedürfnisse der Maus abgestimmten Pharmaka hergestellt werden. Dazu wurden in einer 1 ml-Spritze 300 µl des dissoziativen Anästhetikums Ketaminhydrochlorid 100 mg/ml, wegen seiner hypnotischen, aber wenig viszeralen analgetischen Wirkung (Plumb, 1999) und 100 µl des α_2 -Agonisten Xylazinhydrochlorid 2 %, wegen seiner analgetischen, sedativen und muskelrelaxierenden Wirkung (Gross, 2001) und 600 µl NaCl 0,9 % vermischt. Bei einem intraperitonealen Injektionsvolumen von 60 µl pro 20 g Maus entsprach dies

einer Dosierung von 60 mg/kg Ketaminhydrochlorid und 5 mg/kg Xylazinhydrochlorid. Der Wirkungseintritt begann nach etwa einer Minute. Somit konnte das Narkosestadium der Toleranz erreicht werden, welches über die gesamte Dauer des Eingriffs erhalten blieb. Nach sorgfältigem Überprüfen der Reflexe und Ausbleiben des Zwischenzehenreflexes konnte mit dem Eingriff begonnen werden.

2.2.4.2 Messungen des systolischen rechtsventrikulären Blutdrucks und des systemisch arteriellen Blutdrucks

War die gewünschte Narkosetiefe erreicht, wurde die Maus in Rückenlage gebracht und auf einer Gummimatte innerhalb eines 40°C warmen Wasserbades fixiert. Die Zunge wurde seitlich vorgezogen, um ein nach hinten Verlagern und Verlegen des Rachens zu verhindern. Anschließend wurden Haut und Haarkleid im Halsbereich mit Jod-Lösung angefeuchtet, damit ein etwa 1x1 cm großes Hautareal mit einer chirurgischen Schere entnommen werden konnte, ohne das Operationsfeld mit losen Haaren zu kontaminieren. Daraufhin präparierte man sich stumpf den Weg in die Tiefe frei, indem die *Glandulae mandibulares* seitlich verlagert wurden. Auf diese Weise hatte man freien Blick auf die paarige Zungenbeinmuskulatur. Wurden die *Mm. sternohyoidei median* stumpf auseinanderpräpariert, konnte die Trachea ventral freigelegt und anschließend ringsum auf wenigen Millimetern gelöst werden, so dass Letztere mit einem feinen Polyesterfaden unterlegt werden konnte. Nach Eröffnen der Trachea im Bereich eines *Ligamentum anulare* mittels einer feinen Mikroschere, konnte der Trachealtubus (aus Vasofix® Safety 20 G, gekürzt auf ca. 1,5 cm) intratracheal platziert und mit Hilfe des Polyesterfadens fixiert werden. Die Beatmung erfolgte abhängig vom Körpergewicht mit einem Atemzugvolumen (Volumen, das pro Atemhub appliziert wurde) von 10 µl pro g Körpergewicht bei einer festen Atemfrequenz (Anzahl der applizierten Beatmungszyklen pro Minute) von 150 pro Minute. Eingestellt wurde ein positiv-endexpiratorischer Druck von 1 cm Wassersäule, um ein Kollabieren der Alveolen in der maschinellen Expiration zu vermeiden.

Daraufhin wurde die linke *A. carotis communis* freigelegt und der anliegenden *N. vagus* stumpf gelöst. Um ein unkontrolliertes Austreten von Blut zu verhindern, wurde die *A. carotis communis* kranial anhand eines Polyesterfadens abgebunden, mit einem Tape-Streifen am Wasserbad fixiert und kaudal mit einem Arterienclip temporär verschlossen. Nach mittiger Inzision der *A. carotis communis* mittels einer Mikroschere und erfolgreicher Implantation des kurz zuvor erneut gespülten, arteriellen Katheters, wurde auch dieser mit einem chirurgischen Knoten fixiert und der Arterienclip anschließend gelöst. Die Software vermochte nun den systemisch arteriellen Druck in der *A. carotis communis* aufzuzeichnen, wobei der Blutdruck in [mmHg] auf der Ordinate im Verhältnis zur Zeit in [s] auf der Abszisse dargestellt wurde.

Als nächstes musste die rechte *V. jugularis externa* vom umliegenden Bindegewebe freigelegt werden. Ähnlich wie bei der Arterie wurde sie kranial mit einem Polyester-Faden abgebunden, wobei darauf zu achten war, dass sämtliche venöse Abzweigungen in der Ligatur miterfasst wurden, bzw. einzeln abgebunden wurden, um einen möglichen Blutverlust zu verhindern. Zudem wurde ein zusätzlicher Faden mit vorgelegtem Knoten vorbereitet, mit dem die Vene in ihrem kaudalen Bereich kurz vor dem Brusteingang unter Spannung gehalten werden musste. Dies ermöglichte es auf die Verwendung eines Clips zu verzichten, da Venen durch ihre wesentlich dünnere und schwächer bemuskelte Wand anfälliger gegenüber etwaigen Beschädigungen sind. Wurde nun die *V. jugularis externa* mit der linken Hand ausreichend unter Spannung gehalten, konnte mit der rechten Hand, durch eine mittels Mikroschere angefertigte Inzision, der Katheter in die *V. jugularis externa* eingeführt werden. Durch anschließendes, schnelles Zuziehen des bereits vorgelegten Knotens wurde der Verlust größerer Blutmengen über die Inzisionsstelle verhindert. Anschließend wurde unter Kontrolle des Blutdrucks der Katheter bis in den rechten Ventrikel vorgeschoben, um dort den systolischen rechtsventrikulären Druck zu messen. Die Messung erstreckte sich über einen Zeitraum von etwa 10 Minuten, während dem die Maus im abgedeckten Wasserbad auf Körpertemperatur gehalten wurde.

2.2.4.3 Auswertung des aufgezeichneten systemisch arteriellen und systolisch rechtsventrikulären Blutdrucks

Der systemisch arterielle Blutdruck und der systolisch rechtsventrikuläre Blutdruck werden über die flüssigkeitsgefüllten Katheter an die ebenfalls mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllten Druckaufnehmer weitergeleitet. Diese verstärken das physikalische Signal und wandeln es mit einer Wandlerkarte im PC in ein digitales Signal, das wiederum vom Computerprogramm in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt wird.

2.2.4.4 Probenentnahme

Nach beendeter Messung des SAP und RVSP, wurden mit Hämatokritkapillaren, nach Entfernung der Katheter, jeweils eine Probe arteriellen Blutes aus der inzisierten *A. carotis communis* entnommen, sowie eine Probe venösen Blutes aus der präparierten *V. jugularis externa*, wobei nach der Probenentnahme die Gefäße sofort abgebunden wurden. Die Blutproben wurden sofort über das Blutgasanalyse-Gerät auf Hämatokrit, Sauerstoffpartialdruck und Kohlenstoffdioxidpartialdruck untersucht.

Zur Organentnahme erfolgte dann, nach dem Auftragen von Jod-Lösung auf das Abdomen der Maus, eine mediane Eröffnung der Bauchhöhle im Bereich der *Linea alba* vom Nabel bis zum *Manubrium sterni* mit 2 seitlich ausgeführten Entlastungsschnitten. Dies ermöglichte es die Bauchhöhle auf etwaige Metastasenbildung zu untersuchen. Dann wurde das Diaphragma von kaudal an seinem ventralen Ansatzpunkt am Brustkorb gelöst und der Thorax mit der Schere mittig am Sternum bis zur *Apertura thoracis cranialis* durchtrennt. Durch seitliches Wegklappen der Rippenbögen wurden Lungen und Herz freigelegt, so dass der Herzbeutel entfernt und eine Inzision des linken Ventrikels erfolgen konnte. Dies führte zum schmerzlosen Entbluten und Tod des narkotisierten Tieres.

Nach einer Reduktion des Atemzugvolumens auf 125 µl und der Atemfrequenz auf 100 pro Minute bei der maschinellen Beatmung, erfolgte eine zweite Inzision in den rechten Ventrikel, so dass ein Spülkatheter in die *A. pulmonalis* vorgeschoben und

festgeknotet werden konnte. Über diesen wurde dann ein 1:1 Gemisch aus NaCl 0,9 % und Formalin 3,5-3,7 % mit einem Druck von 22 cm Wassersäule über die Lunge in den linken Ventrikel geleitet, durch dessen Inzision die Spüllösung ablaufen konnte. Dies hatte zur Folge, dass sowohl die gesamte Lunge als auch das Herz blutfrei gespült und von innen mit Fixans behandelt werden konnten. Danach wurden der rechte und der linke Lungenflügel von der Bifurkation abgetrennt und während 24 Stunden in 50 ml Formaldehyd 3,5-3,7 % bei 4°C gelagert. Dann erfolgte mittels Mikroschere die Entnahme des Herzens, Abtrennung aller nicht muskulösen, bindegewebigen Anteile, Gefäße und Vorhöfe, mit anschließender Abtrennung des rechten Ventrikels (RV) vom linken Ventrikel mit Septum (LV+S). Nach dem sofortigen Wiegen der beiden noch feuchten kardialen Hälften wurden auch diese Proben für 24 Stunden in 15 ml Formaldehyd 3,5-3,7 % bei 4°C aufbewahrt. Das Feuchtgewicht beider Herzanteile ermöglichte es 2 Verhältnisse zu bilden zur Beurteilung einer möglichen Rechtsherzhypertrophie: $\text{Ratio1 [\%]} = \text{RV [mg]} / (\text{LV+S}) [\text{mg}]$; $\text{Ratio2 [\%]} = \text{RV [mg]} / \text{Körpergewicht [g]}$ Schließlich endete der Eingriff in der Entnahme einer Probe des Schwanzes zur zweiten Kontrollgenotypisierung der verwendeten genetisch veränderten Tiere. Erstere erfolgte bereits kurz nach der Geburt.

2.2.5 Histologie

2.2.5.1 Fixierung der entnommenen Organproben

Zur Fixierung der während der hämodynamischen Messung entnommenen Organe wurden letztere in ausreichend Formaldehyd 3,5-3,7 % (50 ml für die murine Lunge, 15 ml für das murine Herz) für 24 Stunden bei 4 °C gelagert, bei einer Eindringgeschwindigkeit von 1 mm/h. Formalin dient dazu, die Autolyse zu stoppen, Proteine durch Ausbildung von Methylenbrücken und Brücken per Schiff'sche Basen zu vernetzen und somit die Fäulnis zu verhindern (Mulisch und Welsch, 2010).

Am darauffolgenden Tag wurde die mit Formalin durchtränkte rechte Lungenhälfte anhand eines Skalpells in die einzelnen Lobi aufgeteilt, indem zur Fixierung lediglich der Hilus mit der Pinzette gefasst wurde. Anschließend wurde für jeden Lobus eine Einbettkassette vorbereitet, in der er dann in ein Becherglas PBS 1X verbracht wurde, welches bei 4°C gelagert wurde. Gleiches erfolgte, jedoch ohne Zerkleinerung, mit dem linken Lungenflügel, dem rechten Ventrikel und dem linken Ventrikel mit Septum. Danach folgte während weiteren 2 Tagen der tägliche Wechsel des PBS 1X, so dass sich zusammenfassend auf 1 Tag Formalin 3,5-3,7 % 3 Waschtage mit PBS 1X anschlossen.

Das PBS 1X wurde im Labor selbst hergestellt, indem zunächst eine 20-fach konzentrierte phosphatgepufferte Salzlösung mit folgender Zusammensetzung hergestellt wurde: In 1 l *Aqua dest.* wurden 160 g NaCl, 4 g KCl, 23 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 4 g KH_2PO_4 gelöst. Dies wurde dann bei Gebrauch frisch mit destilliertem Wasser zur 1-fachen Lösung verdünnt und auf einen pH von 7,4 eingestellt.

Schließlich, nach insgesamt 4 Tagen (Entnahme der Organe aus dem Tierkörper, Formaldehyd und PBS), konnten die in Einbettkassetten gehüllten Organe in Ethanol 70 % bei 4°C überführt werden und dem Prozess der Entwässerung ausgesetzt werden.

2.2.5.2 Entwässerung, Einbetten und Schneiden des Gewebes

Um dünne Gewebeschnitte herstellen zu können, wurden die in 70 %igem Ethanol bei 4°C eingelegten Einbettkassetten, welche die einzelnen Lungenlobi und Herzhälften enthielten, als weiterer Fixierungsschritt in den Vakuumgewebeeinfiltrationsautomaten eingeräumt und über Nacht im Routineprogramm entwässert. Während dieses Prozesses wurden die Organe zunächst einer aufsteigenden Alkoholreihe ausgesetzt, um dann mittels Xylol den absoluten Alkohol zu entfernen und die Organe mit flüssigem Paraffin zu durchziehen. Xylol wurde gewählt, weil dies sich gleichermaßen mit Alkohol als auch mit Paraffin mischt. So wurde das in den Organen enthaltene Wasser langsam und schonend entfernt, durch Alkohol, Xylol und später durch Paraffin ersetzt und Lungenflügel und Herzhälften somit haltbar gemacht.

Daraufhin wurden die einzelnen Organe den Einbettkassetten entnommen, in ein passendes Metallförmchen überführt und mit Hilfe der Paraffinausgussstation und flüssigen Paraffins zu einem Block geformt und auf dem Rückenteil der Einbettkassette aufgebracht. Bis zum völligen Erkalten verblieben die gefüllten Metallförmchen auf der Kälteplatte, bis die Blöcke sich ohne großen Druck aus den Schälchen lösen ließen.

Für die anzufertigenden Färbungen musste für jedes Individuum ein Schnitt zur Verfügung stehen. Daher musste zunächst für jede Maus 1 Lungenlobus ausgesucht werden, der sowohl tumorhaltige, als auch tumorlose Areale aufwies. Anschließend wurden von diesem Gewebeblock mit dem Rotationsmikrotom 3 µm dicke Schnitte angefertigt, welche dann in das mit *Aqua dest.* gefüllte Paraffinstreckbad übertragen wurden, um auf Objektträger aufgezogen zu werden. Diese wurden dann auf eine Heizplatte verlagert und bis zur völligen Trocknung auf 40°C geheizt, bevor sie dann bis zur eigentlichen Färbung trocken gelagert wurden.

2.2.5.3 Färbeprotokolle

Die murinen Lungenschnitte aller drei Mausmodelle wurden nach den Protokollen für Hämatoxylin-Eosin und Elastika-van Gieson sowie nach dem einer immunhistochemischen Doppelfärbung mit Anti- α -Aktin und Anti-von Willebrand-Faktor gefärbt. Zusätzlich zu diesen Färbungen wurden die humanen Schnitte auch noch immunhistochemisch mit Hilfe von Anti-CD3, Anti-CD68 und Anti-CD209 gefärbt. Das Protokoll der Sirius Red-Färbung wurde für die murinen rechten Ventrikel verwendet.

2.2.5.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Tabelle 2.12: Färbeprotokoll der Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Nr.	Färbedauer [min]	Reagenz
1	60	Inkubation im Brutschrank bei 58°C
2	10	Xylol
3	10	Xylol
4	10	Xylol
5	5	Ethanol absolut 99,6 %
6	5	Ethanol absolut 99,6 %
7	5	Ethanol 96 %
8	5	Ethanol 70 %
9	2	<i>Aqua dest.</i>
10	20	Hämalaun nach Mayer, sauer
11	5	Leitungswasser, fließend
12	1	Ethanol 96 %
13	4	Eosin-y-alkoholisch
14	Abspülen	<i>Aqua dest.</i>
15	2	Ethanol 96 %
16	2	Ethanol 96 %
17	5	Ethanol absolut 99,6 %
18	5	Isopropylalkohol 99,8 %
19	5	Xylol
20	5	Xylol
21	5	Xylol
22		Eindecken mit Pertex

Bei dieser Färbung wurden als Färbereagenzien das Hämatoxylin und Eosin angewandt. Hämalaun, als aktives Oxidationsprodukt des Hämatoxylins, färbt saure, basophile Zellbestandteile blau, wie z.B. den Zellkern mit DNA. Zunächst erscheint dieser Färbeschritt jedoch rötlich, bis das Hämalaun beim Bläuen in Leitungswasser einem höheren pH ausgesetzt wird und somit einen blauvioletten

Farbton annimmt (Avwioro, 2011). Als saurer Farbstoff färbt das rote Eosin basische Strukturen, wie etwa Zellplasmaeiproteine.

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung, bei der sich Zellkerne, Bakterien und Kalk blau, das azidophile Zytoplasma rot, basophiles Zytoplasma purpur und Kollagen hellrosa darstellen, wurde für Übersichtsaufnahmen angefertigt. So konnte man im Schnitt das Tumor-Areal und das Nicht-Tumor-Areal identifizieren und lokalisieren, welches später bei der Auswertung der Wandstärke und Morphometrie von Bedeutung war.

2.2.5.3.2 *Elastica-van Gieson-Färbung*

Tabelle 2.13: Färbeprotokoll der Elastica-van Gieson-Färbung

Nr.	Färbedauer [min]	Reagenz
1	60	Inkubation im Brutschrank bei 58°C
2	10	Xylol
3	10	Xylol
4	10	Xylol
5	5	Ethanol absolut 99,6 %
6	5	Ethanol absolut 99,6 %
7	5	Ethanol 96 %
8	5	Ethanol 70 %
9	10-24 Stunden	Resorcin – Fuchsin
10	15	Leitungswasser, fließend
11	abspülen	<i>Aqua dest.</i>
12	5	Eisen-Hämatoxylin nach Weigert A und B 1:1, frisch
13	abspülen	<i>Aqua dest.</i>
14	15	Leitungswasser, fließend
15	abspülen	<i>Aqua dest.</i>
16	10	Van-Gieson-Lösung
17	abspülen	<i>Aqua dest.</i>
18	2	Ethanol 96 %
19	2	Ethanol 96 %
20	5	Ethanol absolut 99,6 %
21	5	Isopropylalkohol 99,8 %
22	5	Xylol
23	5	Xylol
24	5	Xylol
25		Eindecken mit Pertex

Dabei wurde die saure Resorcin-Fuchsin-Lösung hergestellt aus:

- 10 ml Weigertes Resorcin-Fuchsin
- 200 ml 1 % HCl-Alkohol (7,2 ml HCl 25 %, 193 g Ethanol 70 %)

Für das immer frisch anzusetzende Eisenhämatoxylin wurden folgende Lösungen verwendet:

- 100 ml Fe-Hämatoxylin nach Weigert A
- 100 ml Fe-Hämatoxylin nach Weigert B

Die Rezeptur der Van Gieson-Lösung lautet:

- 240 ml gesättigte Pikrinsäure (filtriert)
- 8 ml Säurefuchsin 2 %
- 4 ml Essigsäure 1 %

Als Resultat dieser Färbung stellen sich die elastischen Fasern dunkelbraun bis schwarz und Kollagenfasern pink-rot dar. Zytoplasma und Muskelzellen erscheinen in gelb und die Zellkerne in grau bis schwarz (Bruce-Gregorios, 2006). Die Elastica-van Gieson-Färbung diente der Bestimmung der medialen Wandstärke.

2.2.5.3.3 Immunhistochemische Doppelfärbung mit Anti- α -Aktin/von Willebrand-Faktor auf murinem Lungengewebe

Tabelle 2.14: Färbeprotokoll der Anti- α -Aktin/Anti-von Willebrand-Faktor-Doppelfärbung für murines Lungengewebe

Nr.	Färbedauer [min]	Reagenz
1	60	Inkubation im Brutschrank bei 58°C
2	10	Xylol
3	10	Xylol
4	10	Xylol
5	5	Ethanol absolut 99,6 %
6	5	Ethanol absolut 99,6 %
7	5	Ethanol 96 %
8	5	Ethanol 70 %
9	20	H ₂ O ₂ – Methanol Gemisch 6 %, frisch
10	2x5	Aqua dest.
11	2x5	PBS 1X
12	10	Trypsin bei 37°C (1:3 mit Diluent verdünnt)
13	4x5	PBS 1X
14	15	10 % BSA
15	3x5	PBS 1X
16	30	Rodent Block M des Zytomed System
17	3x5	PBS 1X
18	30	Anti- α -Aktin 1:900 mit 10 % BSA verdünnt

19	4x5	PBS 1X
20	20	MM HRP Polymer des Zytomed System
21	3x5	PBS 1X
22	~2	Entwickeln mit Vector VIP Substrat
23	5	Leitungswasser
24	2x5	PBS 1X
25	20	10 % BSA
26	3x5	PBS 1X
27	20	Serumblock 2,5 % Normal Horse Serum des ImmPRESS Reagent Kit Anti-Rabbit Ig
28	30	Anti-vWF 1:1200 mit 10 % BSA verdünnt bei 37 °C
29	5x5	PBS 1X
30	30	Sekundärantikörper des ImmPRESS Reagent Kit Anti-Rabbit Ig Peroxidase
31	4x5	PBS 1X
32	5-10 Sekunden	Entwickeln mit Vector DAB Substrat
33	5	Leitungswasser
34	3	Methylgrün als Gegenfärbung bei 60 °C
35	1	<i>Aqua dest.</i>
36	2	Ethanol 96 %
37	2	Ethanol 96 %
38	5	Isopropylalkohol 99,8 %
39	5	Isopropylalkohol 99,8 %
40	5	Xylol
41	5	Xylol
42	5	Xylol
43		Eindecken mit Pertex

Das 6 %ige Wasserstoffperoxid-Gemisch wurde immer frisch aus 180 ml reinstem Methanol und 20 ml H₂O₂ 30 % hergestellt.

Zur Verdünnung der verwendeten Antikörper und zum Verhindern unspezifischer Bindungen des Primärantikörpers, wurde als Blocking-Agent BSA 10 % eingesetzt. Dies wurde anhand folgender Reagenzien hergestellt: 20 g BSA, 2 mM NaN₃, 200 ml PBS 1X.

Diese speziell an Mausgewebe angepasste Färbung wurde durchgeführt, um anschließend anhand einer computergestützten Software den Gehalt an α -smooth-muscle-actin in der *Tunica media* der pulmonalen Gefäße zu messen. Durch die angewandte Peroxidase-Technik, welche sowohl das VIP- als auch das DAB-Substrat spaltet, färbte sich die glatte Muskulatur violett und das Endothel braun. Auf diese Weise wurde durch die Markierung des Endothels das Auffinden der Gefäße erleichtert und die computergestützte Erfassung des Gehalts an α -Aktin ermöglicht.

2.2.5.3.4 Immunhistochemische Doppelfärbung mit Anti- α -Aktin/ von Willebrand-Faktor auf humanem Lungengewebe

Tabelle 2.15: Färbeprotokoll der Anti- α -Aktin/Anti-von Willebrand-Faktor-Doppelfärbung für humanes Lungengewebe

Nr.	Färbedauer [min]	Reagenz
1	60	Inkubation im Brutschrank bei 58°C
2	10	Xylol
3	10	Xylol
4	10	Xylol
5	5	Ethanol absolut 99,6 %
6	5	Ethanol absolut 99,6 %
7	5	Ethanol 96 %
8	5	Ethanol 70 %
9	15	H ₂ O ₂ – Methanol Gemisch 15 % frisch
10	2x5	<i>Aqua dest.</i>
11	2x5	PBS 1X
12	10	Trypsin bei 37°C (1:3 mit Diluent verdünnt)
13	4x5	PBS 1X
14	15	10 % BSA
15	2x5	PBS 1X
16	10	2,5 % Normal Horse Serum, Universal Quick Kit
17	30	Anti- α -Aktin 1:900 mit 10 % BSA verdünnt bei 37 °C
18	4x5	PBS 1X
19	10	Biotinylierter Sekundär-Antikörper, Universal Quick Kit
20	3x5	PBS 1X
21	5	Streptavidin Peroxidase Complex, Universal Quick Kit
22	3x5	PBS 1X
23	40 Sekunden	Entwickeln mit Vector VIP Substrat
24	5	Leitungswasser
25	5	PBS 1X
26	15	10 % BSA
27	2x5	PBS 1X
28	20	Serumblock 2,5 % Normal Horse Serum des ImmPRESS Reagent Kit Anti-Rabbit Ig
29	30	Anti-vWF 1:1200 mit 10 % BSA verdünnt bei 37 °C
30	4x5	PBS 1X
31	30	Sekundärantikörper des ImmPRESS Reagent Kit Anti-Rabbit Ig Peroxidase
32	2x5	PBS 1X
33	5-10 Sekunden	Entwickeln mit Vector DAB Substrat
34	5	Leitungswasser
35	3	Methylgrün als Gegenfärbung bei 60 °C
36	1	<i>Aqua dest.</i>
37	2	Ethanol 96 %
38	2	Ethanol 96 %
39	5	Isopropylalkohol 99,8 %
40	5	Isopropylalkohol 99,8 %
41	5	Xylol
42	5	Xylol
43	5	Xylol
44		Eindecken mit Pertex

Das 15 %ige Wasserstoffperoxid-Gemisch wurde wie folgt frisch hergestellt:

- 100 ml Methanol, reinst
- 100 ml H₂O₂ 30 %

Anders als bei der murinen Doppelfärbung, bei der die Verwendung eines murinen Primärantikörpers auf Mausgewebe spezielle endogene Maus-IgG-Blocking-Schritte nötig machte, konnte bei der Färbung humanen Gewebes auf das herkömmliche universelle Kit zurückgegriffen werden. Auch bei den humanen Lungentumorschnitten konnte der Muskularisierungsgrad der pulmonalen Gefäße anhand dieser Färbung mit der computergestützten Software gemessen werden.

2.2.5.3.5 Immunhistochemische Färbung mit Anti-CD3 auf humanem und murinem Lungengewebe

Zur spezifischen Zellzählung der CD3-positiven T-Lymphozyten in den Wänden der pulmonalen Gefäße wurde diese mittels Peroxidase-Methode angefertigte immunhistochemische Färbung verwendet. Sie ermöglichte es, die im Bereich des T-Zell-Rezeptors in der Plasmamembran rot-braun angefärbten T-Lymphozyten von den restlichen, durch das Hämatoxylin blau gegengefärbten Zellen abzugrenzen und somit, mittels computergestützter Software, zu zählen.

Für diese Färbung wurde Zitratpuffer benötigt, der folgendermaßen aus 20-fachem Konzentrat verdünnt werden musste:

- 95 ml *Aqua dest.*
- 5 ml Citrate Buffer 20X

Tabelle 2.16: Färbeprotokoll der Anti-CD3-Färbung auf humanem und murinem Lungengewebe

Nr.	Färbedauer [min]	Reagenz
1	60	Inkubation im Brutschrank bei 58°C
2	10	Xylol
3	10	Xylol
4	10	Xylol
5	5	Ethanol absolut 99,6 %
6	5	Ethanol absolut 99,6 %
7	5	Ethanol 96 %
8	5	Ethanol 70 %
9	2x5	<i>Aqua dest.</i>
10	20	Im Zitratpuffer pH 6 kochen (Reiskocher eingeschaltet)
11	10	Im Zitratpuffer pH 6 warm halten (Reiskocher abgeschaltet)
12	30	Im Zitratpuffer pH 6 abkühlen lassen (außerhalb des Reiskochers)
13	1	<i>Aqua dest.</i>
14	20	H ₂ O ₂ -Methanol Gemisch 15 %
15	2x5	<i>Aqua dest.</i>
16	2x5	PBS 1X
17	15	Proteinase K
18	1	<i>Aqua dest.</i>
19	2x5	PBS 1X
20	60	10 % BSA
21	2x5	PBS 1X
22	20	Serumblock 2,5 % Normal Horse Serum des ImmPRESS Reagent Kit Anti-Rabbit Ig
23	Über Nacht	Auf humaner Lunge: Anti-CD3 1:150 mit Antibody Diluent verdünnt Auf Mauslunge: Anti-CD3 1:400 mit Antibody Diluent verdünnt
24	2 Stunden	PBS 1X
25	30	Sekundärantikörper des ImmPRESS Reagent Kit Anti-Rabbit Ig Peroxidase
26	3x5	PBS 1X
27	~40 Sekunden	Entwickeln mit Vector NovaRED Substrat
28	5	Leitungswasser
29	35 Sekunden	Hämatoxylin
30	10 Sekunden	Leitungswasser
31	2	Ethanol 96 %
32	2	Ethanol 96 %
33	5	Isopropylalkohol 99,8 %
34	5	Isopropylalkohol 99,8 %
35	5	Xylol
36	5	Xylol
37	5	Xylol
38		Eindecken mit Pertex

2.2.5.3.6 Immunhistochemische Färbung mit Anti-CD68 auf humaner Lunge

Da es sich bei dem in dieser Färbung verwendeten Anti-CD68-Primärantikörper um einen murinen Antikörper handelt, unterscheidet sich das für diese immunhistochemische Färbung anzuwendende Protokoll vom Protokoll der Anti-CD3-Färbung (Tabelle 2.16) lediglich bei der Verwendung des ImmPRESS Reagent Kit Anti-Mouse Ig, anstelle des Anti-Rabbit-Ig-Kits. Daher soll das Protokoll an dieser Stelle nicht erneut aufgeführt werden. Der Anti-CD68-Antikörper wurde in einer Konzentration von 1:100 aufgebracht.

Durch die Verwendung der Peroxidase-Methode in Kombination mit dem NovaRED-Substrat stellten sich die Makrophagen in rötlich-brauner Farbe dar.

2.2.5.3.7 Immunhistochemische Färbung mit Anti-CD209 auf humaner Lunge

Die immunhistochemische Färbung mit dem Anti-CD209-Antikörper zur spezifischen Färbung der dendritischen Zellen verlief nach exakt dem gleichen Färbeprotokoll wie die vorangegangene Färbung mit Anti-CD68 unter Verwendung des ImmPRESS Reagent Kit Anti-Mouse Ig. Da es sich in beiden Fällen um einen aus der Maus gewonnenen, monoklonalen Antikörper handelt, konnten die gleichen Reagenzien verwendet werden. Jedoch wurde der Anti-CD209-Antikörper als Primärantikörper in der Konzentration 1:10 eingesetzt.

Diese Methode färbte die dendritischen Zellen in einem rötlich-braunen Farbton an, so dass sie sich sichtbar von den restlichen blauangefärbten Zellen absetzten und durch die computergestützte Software ermittelt werden konnten.

2.2.5.3.8 Sirius-Red-Färbung

Tabelle 2.17: Färbeprotokoll der Sirius-Red-Färbung

Nr.	Färbedauer [min]	Reagenz
1	60	Inkubation im Brutschrank bei 58°C
2	10	Xylol
3	10	Xylol
4	10	Xylol
5	5	Ethanol absolut 99,6 %
6	5	Ethanol absolut 99,6 %
7	5	Ethanol 96 %
8	5	Ethanol 70 %
9	abspülen	<i>Aqua dest.</i>
10	60	0,1 % Picro Sirius Red (lichtgeschützt) (0,2 g Sirius Red in 200 ml filtrierter Pikrinsäure, pH 2,0)
11	2	Waschen in Essigsäure 1 %
12	2	Waschen in Essigsäure 1 %
13	2	Waschen in Essigsäure 1 %
14	abspülen	<i>Aqua dest.</i>
15	5	Ethanol 70 %
16	5	Ethanol 96 %
17	5	Ethanol absolut 99,6 %
18	5	Xylol
19	5	Xylol
20		Eindecken mit Pertex

Die rechten Ventrikel wurden auf eine mögliche Zunahme des Kollagengehalts mittels dieser Sirius-Red-Färbung analysiert. Sie ermöglicht nämlich quantitative morphometrische Messungen anhand einer Computer-gestützten Bildanalyse-Software (Hadi *et al.*, 2010). Bei dieser Färbung stellen sich die Kollagenfasern in Rot und das Zytoplasma der Muskelfasern in Gelb dar.

2.2.6 Histologische Auswertung

2.2.6.1 Bestimmung des Tumor-Areals und Nicht-Tumor-Areals

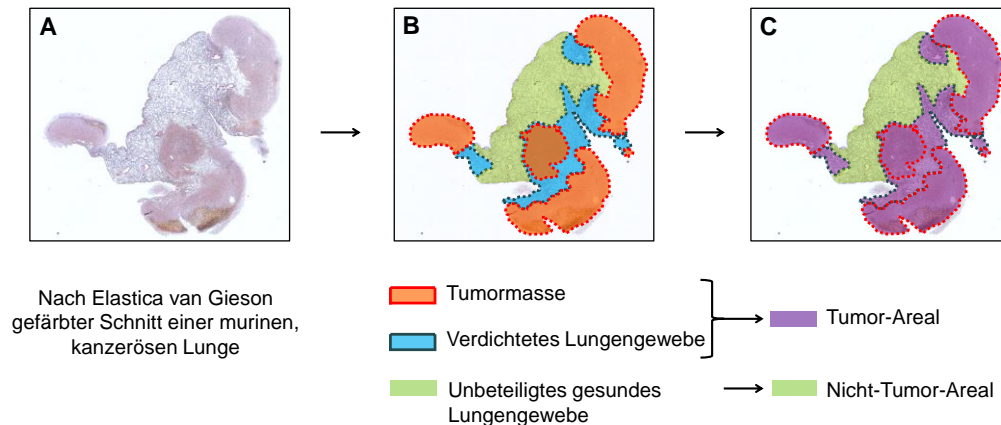


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des Tumor-Areals und Nicht-Tumor-Areals

Nach Elastica-van Gieson gefärbter muriner Lungenlappen des LLC1-Lungentumor-Modells.

Für sämtliche histologische Auswertungen wurde der Lungengewebschnitt in das Nicht-Tumor-Areal und das Tumor-Areal unterteilt, wobei sich Letzteres makroskopisch aus den massiven Tumorknoten oder Tumorphenchym und dem deutlich verdichteten anliegenden Lungengewebe zusammensetzt. Dies ermöglichte es, zum einen zu ermitteln, ob Veränderungen der Gefäße, wenn vorhanden, nur in einem gewissen Teil des Lungenparenchyms vorkamen oder die gesamte Lunge betroffen war und zum anderen eine mögliche Kontrolle aus demselben Schnitt zu erstellen. Dabei war besonders zu achten, dass das extratumoral gelegene Nicht-Tumor-Gewebe deutlich außerhalb des Tumors gelegen ist und von absolut keinen Tumorzellen umgeben ist. Dieses Verfahren wurde bereits bei Shimada *et al.* angewendet (Shimada *et al.*, 2010).

Bei der Anwendung der unterschiedlichen, computergestützten Softwareprogramme wurden die zu jedem Gefäß erhobenen Rohdaten in einer Excel-Datei automatisch gespeichert. Manuell wurde anschließend je nach Areal, in dem sich das Gefäß befunden hatte, vermerkt, ob es sich um ein Tumor- oder Nicht-Tumor-Gefäß handelte. Dies ermöglichte bei der finalen Auswertung die Gefäße des Tumor-Areals mit denen des Nicht-Tumor-Areals zu vergleichen.

2.2.6.2 Anzahl der vermessenen Gefäße

Für jedes Individuum wurde pro Färbung jeweils 1 repräsentativer Schnitt ausgezählt, der sowohl Tumor-Areal als auch Nicht-Tumor-Areal aufwies. Dieser entstammte meist dem größten linken Lungenflügel, wobei je nach Tumorverteilung auch Schnitte aus anderen Lobi Anwendung fanden. Bei jedem Auswertungsschritt wurde in dem ausgewählten Lungenschnitt die gleiche Gefäßanzahl ausgewertet, sowohl bei der morphometrischen Beurteilung von Wandstärke und Muskularisierungsgrad muriner und humaner Lungenschnitte als auch bei der Bestimmung des intramuralen Immunzellgehalts pulmonaler Gefäße in humanen Schnitten.

Die Messungen erfolgten in den Mausmodellen bei 100 Gefäßen im Tumor-Areal und 100 im Nicht-Tumor-Areal, wobei sich diese jeweils 100 Gefäße in 85 Gefäße mit einem Durchmesser von 20-70 µm, 10 Gefäße von 71-150 µm und 5 Gefäße von >150 µm aufteilten. Zudem wurden in den Maus-Kontrolllungen auf die gleiche Weise 100 Gefäße gezählt. Bei den humanen Lungentumorschnitten wurden je 110 Gefäße im Tumor-Areal und Nicht-Tumor-Areal bestimmt. In diesem Fall ergaben sich diese 110 Gefäße aus 85 kleinen Gefäßen (Ø 20-50 µm), 20 mittleren Gefäßen (Ø 51-150 µm) und 5 großen Gefäßen (Ø >150 µm).

2.2.6.3 Morphometrische Analyse der medialen Wandstärke

Zur Bestimmung der Wandstärke der pulmonalen Gefäße war eine Elastica-Van Gieson-Färbung aller Mausmodelle und der humanen Lungenschnitte notwendig. Anhand dieser Färbung wurde es möglich die braunschwarzen *Membranae elasticae interna* und *externa* in der gelblich gefärbten *Tunica media* zu visualisieren und deren Übergang in die rote *Adventitia* zu markieren. Die nachfolgende Messung der Wanddicke erfolgte mit dem entsprechenden Software-Makro in der 400-fachen Vergrößerung vom äußersten Punkt der *Membrana elastica externa* bis in das Gefäßlumen. Zur Berechnung der medialen Wandstärke wurde dieser gemessene Abstand in ein Verhältnis zum externen Gefäßdurchmesser gesetzt:

$$\text{Mittlere Wandstärke} = \frac{2 \times \text{Mediadicke}}{\text{Externer Gefäßdurchmesser}} \times 100$$

Bei der computergestützten Ausmessung, musste zunächst das Gefäß im Lumen markiert werden. Dann wurde das Lumen von der Software detektiert, welches dann manuell bestätigt werden musste. Als nächster Schritt wurden manuell mehrere über das gesamte Gefäß verteilte Linien beginnend an der *Membrana elastica externa* bis ins Gefäßlumen senkrecht zu der Lumenbegrenzung gezogen. Anschließend berechnete die Software automatisch die mediale Wandstärke, um sie dann mit Angabe der Gefäßgröße in einer Excel-Datei zu speichern. In diese Datei wurde dann schließlich die Zugehörigkeit des gerade vermessenen Gefäßes zum Tumor-Areal oder Nicht-Tumor-Areal manuell eingetragen.

2.2.6.4 Morphometrische Analyse des Muskularisierungsgrades

Die Anti- α -smooth-muscle-Actin/Anti-von Willebrand-Faktor-Doppelfärbung diente dazu gezielt den Gehalt an α -Aktin und somit den Muskularisierungsgrad der pulmonalen Gefäße zu bestimmen. Dafür wurde mit dem Software-Makro für Muskularisierungsgrad zunächst bei 400facher Vergrößerung ein Gefäß aufgesucht, das durch sein bräunlich gefärbtes Endothel leicht aufzufinden war. Dann wurde es manuell im Lumen markiert und das Gefäßlumen automatisch detektiert. Wurde dieser Schritt noch manuell bestätigt, ermittelte die Software anschließend automatisiert die Gefäßwand. Mittels kolorimetrisch-spektrometrischer Messung erfasste die Software dann den Anteil der muskularisierten violetten Wandbereiche. Lagen diese Anteile $\leq 5\%$, wurde das Gefäß als nicht-muskularisiert eingestuft. Bei Anteilen von 5-75 % entspricht die Klassifikation einer partiellen Muskularisierung und $>75\%$ einer vollen Muskularisierung. Die Rohdaten wurden, nach Auswertung jedes Gefäßes, mit Angabe der Gefäßgröße in eine Excel-Datei überführt, in die manuell das Vorkommen im Tumor- oder Nicht-Tumor-Areal notiert wurde.

2.2.6.5 Bestimmung der vaskulären Zellzahlen CD3-, CD68- und CD209-positiver Zellen

Ziel war es, entsprechend der Methoden der Gefäßmorphometrie, den Gehalt an Immunzellen in den humanen pulmonalen Gefäßen zu erfassen. Es wurden in den 3 angefertigten Färbungen alle jeweils positiven, angefärbten Zellen in der *Tunica intima*, *Tunica media* und *Tunica externa* gezählt und entsprechend der Größe des ausgezählten Gefäßes sortiert. Dafür wurde das Makro des Muskularisierungsgrads verwendet, da dieses die Wände manuell markierter Gefäße ausmisst und somit die jeweiligen Gefäßgrößen in einer Excel-Datei zusammenfasst. Anschließend wurde für das eben vermessene Gefäß manuell die Anzahl positiver Zellen in der Gefäßwand mit Angabe der Zugehörigkeit zum Tumor-Areal oder Nicht-Tumor-Areal in die Excel-Datei hinzugefügt.

2.2.6.6 Analyse des Kollagengehalts des rechten Ventrikels

Bei der 400fachen Vergrößerung wurde der mittels Sirius-Red gefärbte rechte Mausventrikel mit dem Makro für Kollagen auf seinen Kollagengehalt analysiert. Dafür wurde das sich in rot darstellende Kollagen im Verhältnis zu den gelben Kardiomyozyten erfasst und in Prozent wiedergegeben. Manuell mussten alle weißen Randbereiche, das Epikard sowie sämtliches vaskuläre Kollagen um die myokardialen Gefäße entfernt werden. Untersucht wurden 50 Bildausschnitte, wobei der Schnitt meanderförmig abgefahren wurde und jedes zweite Bild analysiert wurde. Der Kollagengehalt wurde dann als Mittelwert aller Einzelbilder berechnet.

2.2.7 Statistische Auswertung

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben. Die n-Zahlen der jeweiligen Gruppen werden ebenfalls angeführt. Die Normalverteilung wurde getestet. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden einerseits durch Varianzanalyse (ANOVA – analysis of variance) mit dem Student-Newman-Keuls post-hoc Test für multiple Vergleiche ermittelt. Andererseits fand der t-Test für ungepaarte Stichproben Anwendung zur Analyse von lediglich zwei unabhängigen Gruppen (wie z.B. Kollagengehalt der rechten Ventrikel zwischen gesunden und kranken Individuen und vaskulärer T-Lymphozyten-Gehalt im Tumor-Areal vs. Nicht-Tumor-Areal). Ein p -Wert von $<0,05$ wurde als signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Tierexperimentelle Studien

3.1.1 LLC1-Lungentumormodell

3.1.1.1 Allgemeinbefinden und klinische Befunde

Für den Versuch der intravenösen Schwanzveneninjektion maligner Tumorzellen wurden männliche Tiere mit einem Gewicht von 20-22 g verwendet. Anfangs zeigten die verwendeten C57BL/6N, nach einem kurzen Einbruch, eine kontinuierliche Gewichtszunahme bis zum 10.-12. Tag. Danach verzeichnete sich eine Verschlechterung des Allgemeinbefindens, zunehmend charakterisiert durch Gewichtsstagnation, -verlust, Dyspnoe, erhöhte Atemfrequenz mit abdominal betonter Atmung, ruhigerem Verhalten und Bewegungseinschränkung. Der Spiel- und Explorationsdrang war vermindert. Vereinzelt zeigten Tiere zusätzlich Symptome, wie Apathie, stumpfes Fell mit Piloarreaktion oder aufgekrümmter Rücken kurz vor dem Erreichen des 18. Tages, so dass diese Mäuse 1-2 Tage früher der hämodynamischen Untersuchung zugeführt werden mussten.

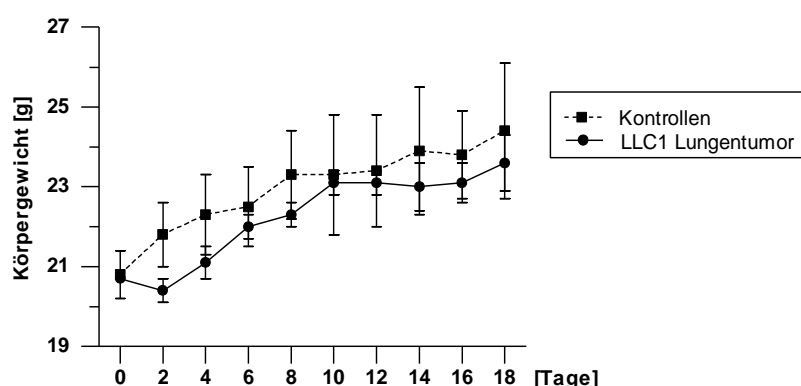


Abbildung 3.1: Verlaufsdarstellung des Mausgewichts im LLC1-Lungentumormodell

Das Gewicht von C57BL/6N-Mäusen nach intravenöser Injektion von 1 Million LLC1-Zellen wird verglichen mit dem NaCl-injizierter Mäuse während 18 Tagen.

Bei identischem Ausgangsgewicht wiesen die an Adenokarzinomen leidenden Mäuse im Mittel eine Gewichtszunahme von $1,7 \pm 0,7$ g auf, wobei das Gewicht der C57BL/6N-Kontrolltiere, die eine Injektion von 100 μ l NaCl erhielten, um $3,5 \pm 0,4$ g anstieg. Neben dem Vorhandensein von multiplen, nodulären bis konvergierenden Lungentumoren in allen LLC1-injizierten Mäusen, manifestierten sich pleurale Metastasen in einer Maus und eine weitere wies nach echokardiographischem Befund einen linksventrikulären Thrombus mit Herzrotation und Hämoperikard auf. Letztere verstarb bereits an Tag 14.

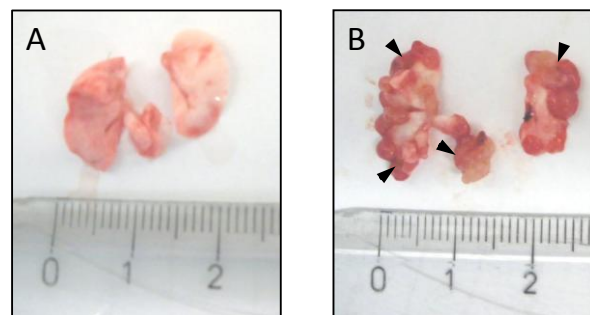


Abbildung 3.2: Makroskopische Lungenaufnahme beim LLC1-Lungentumormodell

Im Vergleich zu gesunden Kontrolllungen (**A**) zeigten die Lungen des LLC1-Lungentumormodells multiple noduläre bis konfluente Adenokarzinome der Lunge (**B**). **Pfeilspitzen** zeigen die Neoplasien an.

3.1.1.2 Echokardiographie

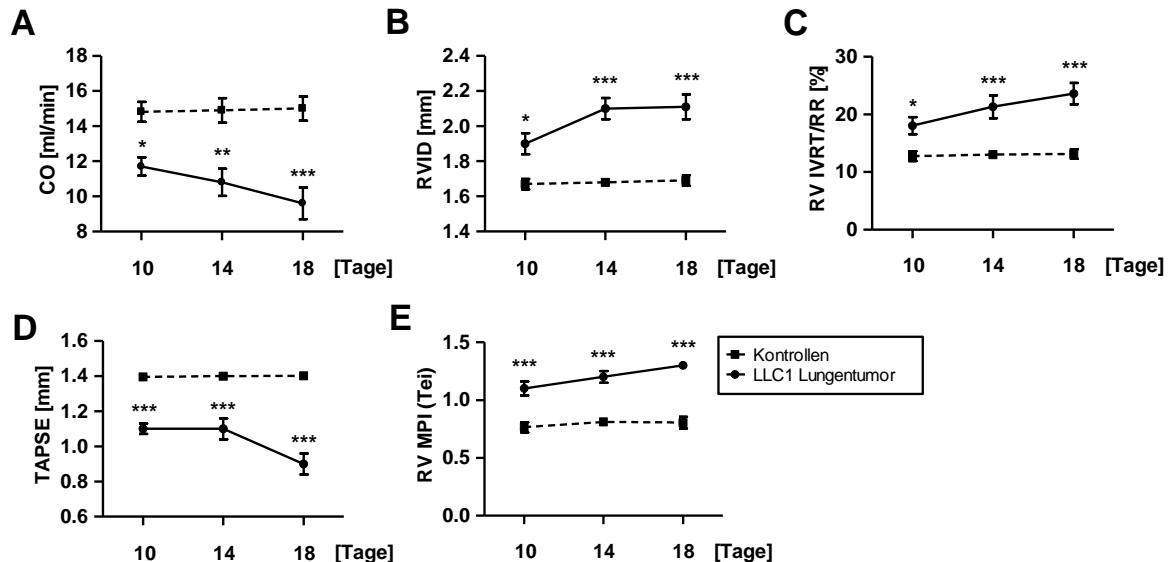


Abbildung 3.3: Graphische Verlaufsdarstellung der echokardiographisch erhobenen Parameter des Lewis Lung Carcinoma 1-Lungentumormodells im Vergleich zu gleichaltrigen gesunden Kontrollen am 10., 14. und 18. Tag nach Tumorzellinjektion

(A) CO: Herzminutenvolumen (n=6-10). (B) RVID: Innerer Durchmesser des rechten Ventrikels (n=6-10). (C) RV IVRT/RR: isovolumetrische Relaxationszeit (n=5-6). (D) TAPSE: systolische Bewegung des Trikuspidalanulus (n=6-10). (E) RV MPI: Myokardialer Leistungsindex des rechten Ventrikels (n=6-10). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 – vs. gesunde Kontrollen.

Cardiac Output

10 Tage nach Tumorzellinjektion zeigten die Lungenkrebsmäuse ein beeinträchtigtes Herzminutenvolumen von im Schnitt $11,70 \pm 0,52$ ml/min. Im weiteren Verlauf verschlechterte sich der CO auf $10,80 \pm 0,77$ ml/min, um nach 18 Tagen $9,60 \pm 0,90$ ml/min zu betragen. Das Herzzeitvolumen der C57BL/6N-Kontrolltiere blieb während des gesamten Verlaufs auf einem konstant, signifikant erhöhten Niveau von $14,81 \pm 0,57$ ml/min nach 10 Tagen ($p<0,05$), von $14,90 \pm 0,70$ ml/min nach 14 Tagen ($p<0,01$) und von $15,00 \pm 0,69$ ml/min nach 18 Tagen ($p<0,001$) (Siehe Abb. 3.3 (A)). Im LLC1-Lungentumor konnte somit mit ansteigender Tumorlast eine stetig abfallende Pumpleistung des Herzens verzeichnet werden.

Innerer Durchmesser des rechten Ventrikels

Wie in Abb. 3.3 (B) zu erkennen, litten die LLC1-Mäuse bereits nach 10 Tagen mit durchschnittlich $1,90 \pm 0,06$ mm an einem signifikant vergrößerten rechten Ventrikel im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren mit $1,67 \pm 0,03$ mm ($p < 0,05$). Im weiteren Verlauf trat nach 14 Tagen bei den Lungentumormodellen, im Vergleich zu den C57BL/6N-Wildtypen, eine weitere Vergrößerung des rechten Ventrikels auf ($2,10 \pm 0,06$ vs. $1,68 \pm 0,02$ mm; $p < 0,001$). Diese signifikante Rechtsherzdilatation blieb bis zum 18. Tag konstant mit im Mittel $2,11 \pm 0,07$ mm, wohingegen der rechte Ventrikel der gesunden Kontrollen Weiten von $1,75 \pm 0,03$ mm aufwies ($p < 0,001$). Somit konnte bei dem LLC1-Lungentumormodell eine signifikante Rechtsherzdilatation nachgewiesen werden.

Isovolumetrische Relaxationszeit des rechten Ventrikels

Bereits bei der ersten echokardiographischen Untersuchung an Tag 10 nach der Tumorzellinjektion, boten die Lungenkrebsmäuse eine signifikant erhöhte Relaxationszeit des rechten Ventrikels dar, im Vergleich zu gesunden Kontrollen ($18,0 \pm 1,5$ % vs. $12,7 \pm 0,8$ %; $p < 0,05$). Dieser Anstieg wuchs stetig im weiteren Verlauf der tierexperimentellen Studie, so dass sich nach 14 Tagen eine Erhöhung des IVRT/RR auf $21,3 \pm 2,0$ % im Verhältnis zu den Kontrolltieren ($13,0 \pm 0,4$ %; $p < 0,001$) nachweisen ließ. Nach 18 Tagen erreichte der IVRT/RR seinen maximalen Wert, verglichen mit den uninduzierten C57BL/6N-Mäusen ($23,6 \pm 1,9$ % vs. $13,1 \pm 0,8$ %; $p < 0,001$). Daraus konnte auf eine signifikant beeinträchtigte diastolische Relaxationsfunktion des rechten Ventrikels im LLC1-Lungentumormodell geschlossen werden (Siehe Abb. 3.3 (C)).

TAPSE - Systolische Bewegung des Trikuspidalanulus

Die systolische Bewegung des Trikuspidalanulus gilt als Maß für die systolische Kontraktionsfähigkeit des rechten Ventrikels. Während sie bei den gesunden Kontrolltieren über den gesamten Versuchsverlauf bei $1,40 \pm 0,04$ mm konstant blieb, stellte sich bereits nach 10 Tagen in der Lungenkrebsgruppe eine signifikante Abnahme dieses Parameters dar ($1,10 \pm 0,03$ mm; $p < 0,001$). Nach 14 Tagen erreichte der Wert durchschnittlich $1,10 \pm 0,06$ mm und nach 18 Tagen

0,90 ± 0,06 mm. Dabei verhielt sich die TAPSE signifikant verringert im Vergleich zu den gesunden Kontrollen ($p < 0,001$) (Siehe Abb. 3.3 (D)). Die systolische Kontraktionsfähigkeit des rechten Ventrikels der LLC1-Mäuse ist somit beeinträchtigt.

Myokardialer Leistungsindex des rechten Ventrikels

Die Messung des RV MPI zur Beurteilung der globalen Funktion des rechten Ventrikels demonstrierte bereits nach 10 Tagen einen signifikanten Anstieg bei den LLC1-Mäusen (1,10 ± 0,06), im Vergleich zu den gesunden C57BL/6N (0,76 ± 0,04) ($p < 0,001$). Nach 4 Tagen nahm der RV MPI bei der kranken Untersuchungsgruppe erneut zu im Verhältnis zu den Wildtypen (1,20 ± 0,05 vs. 0,81 ± 0,03; $p < 0,001$). Gleiches wurde nach weiteren 4 Tagen beobachtet (1,30 ± 0,03 vs. 0,81 ± 0,05; $p < 0,001$). Die globale Funktion des rechten Ventrikels erkrankter Mäuse stellte sich daher mit zunehmender Tumorlast als beeinträchtigt dar. (Siehe Abb. 3.3 (E)).

3.1.1.3 Invasive Untersuchung

Rechtsventrikulärer systolischer Druck, systemisch arterieller Druck und totaler pulmonaler Widerstand

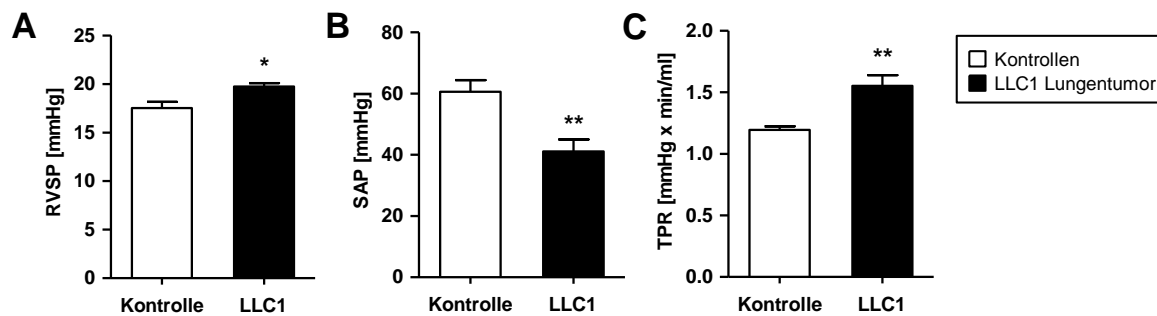


Abbildung 3.4: Graphische Darstellung der während der invasiven Untersuchung erhobenen Drücke beim LLC1-Lungentumormodell

(A) RVSP: Rechtsventrikulärer systolischer Druck (n=5-10). (B) SAP: Systemisch arterieller Druck (n=7-10). (C) TPR: Totaler pulmonaler Widerstand (n=6). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ – vs. gesunde Kontrollen.

Wie aus Abb. 3.4 (A) ersichtlich, lag der durchschnittliche rechtsventrikuläre systolische Druck bei LLC1-induzierten Lungenkrebsmäuse am 18. Tag mit einem Wert von $19,7 \pm 0,4$ mmHg signifikant höher als bei den gesunden C57BL/6N Kontrolltieren, die einen Druck von $17,5 \pm 0,6$ mmHg aufwiesen ($p < 0,05$).

Der systemisch arterielle Druck fiel bei den Adenokarzinom-beherbergenden Mäusen bei der invasiven Messung der Hämodynamik signifikant schwächer aus als bei den uninduzierten, gleichaltrigen C57BL/6N ($41,1 \pm 4,0$ mmHg vs. $60,6 \pm 3,8$ mmHg; $p < 0,01$) (Abb. 3.4 (B)).

Der totale pulmonale Widerstand, als wichtiger Parameter zur Beurteilung von pulmonaler Hypertonie im Falle einer beeinträchtigten systemischen Blutzirkulation, deckte durch Einbeziehung des Herzminutenvolumens einen signifikant erhöhten Widerstand in der Lunge der LLC1-Mäuse auf. Mit einem Wert von durchschnittlich $1,55 \pm 0,09$ mmHg x min/ml war er sich deutlich erhöht im Vergleich zum totalen pulmonalen Widerstand gesunder Kontrolltiere mit $1,20 \pm 0,03$ mmHg x min/ml ($p < 0,01$) (Abb. 3.4 (C)).

Rechtsherzhypertrophie und Hämatokrit

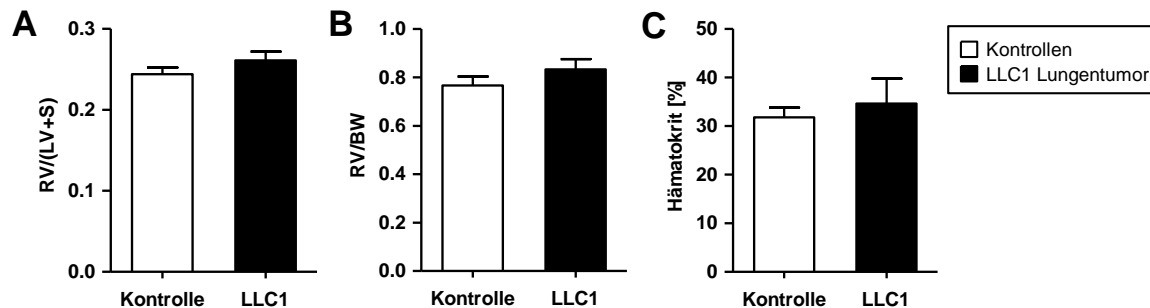


Abbildung 3.5: Graphische Darstellung der Parameter der Rechtsherzhypertrophie und des Hämokrits beim LLC1-Lungentumormodell

(A) $RV/(LV+S)$: Gewichtsverhältnis zwischen rechtem Ventrikel und linkem Ventrikel plus Septum (n=10). (B) RV/BW : Gewichtsverhältnis zwischen rechtem Ventrikel und Körpergewicht (n=10). (C) Hämatokrit (n=8-10).

Als Maß für die sich bei pulmonaler Hypertonie entwickelnde Rechtsherzhypertrophie, wurde das Gewicht des rechten Ventrikels einerseits ins Verhältnis zum Gewicht des linken Ventrikels plus Septum und andererseits zum Körpergewicht der Maus gebracht. Wie aus Abb. 3.5 ersichtlich, fand bei dem LLC1-Lungentumormodell, weder bei der Berechnung der Herzratio mittels linkem Ventrikel plus Septum ($0,26 \pm 0,01$), noch bei der Berechnung mittels Körpergewicht ($0,83 \pm 0,04$) eine Gewichtszunahme des rechten Ventrikels statt. Im Vergleich dazu beliefen sich die Werte der gesunden, uninduzierten C57BL/6N auf $0,24 \pm 0,01$ bzw. $0,77 \pm 0,04$.

Der Hämatokrit verhielt sich mit durchschnittlichen Werten von $34,6 \pm 5,1$ % in der Versuchsgruppe ähnlich wie bei der gesunden Kontrollgruppe mit im Mittel $31,8 \pm 2,0$ % (Abb. 3.5 (C)).

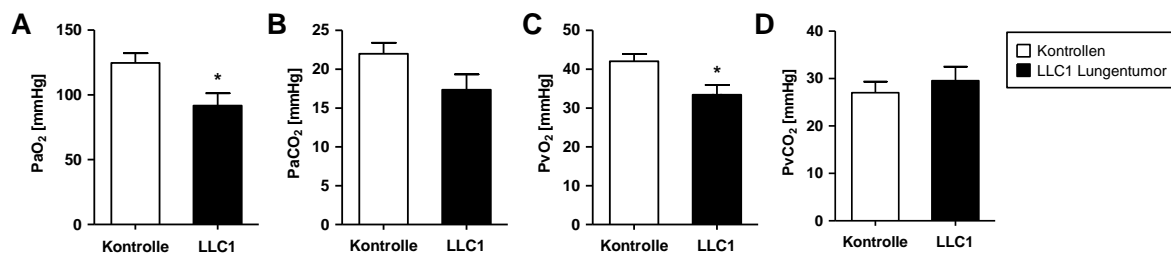
Blutgase

Abbildung 3.6: Graphische Darstellung der während der invasiven Untersuchung erhobenen Blutgase beim LLC1-Lungentumormodell

(A) P_{aO_2} : Sauerstoffpartialdruck im arteriellen Blut (n=9-10). (B) P_{aCO_2} : Kohlenstoffdioxidpartialdruck im arteriellen Blut (n=9). (C) P_{vO_2} : Sauerstoffpartialdruck im venösen Blut (n=8). (D) P_{vcO_2} : Kohlenstoffdioxidpartialdruck im venösen Blut (n=8-10). * $p < 0,05$ – vs. gesunde Kontrollen.

Es wurden jeweils der Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxidpartialdruck im arteriellen Blut aus der *A.carotis communis* und im venösen Blut aus der *V.jugularis externa* gemessen. Wie aus Abb. 3.6 (A) ersichtlich, stellte sich der Sauerstoffpartialdruck im arteriellen Blut bei den Adenokarzinomen aufweisenden Mäusen, im Vergleich zu den gesunden Kontrollen ($119,5 \pm 8,5$ mmHg), signifikant verringert dar ($91,8 \pm 9,5$ %; $p < 0,05$).

Abb. 3.6 (B) und (D) zeigen nur schwache nicht signifikante Veränderungen des Kohlendioxidpartialdrucks. So ließ dieser einen Abfall im arteriellen Blut der Lungenkrebsmäuse mit Werten von $17,3 \pm 2,0$ mmHg im Verhältnis zur Kontrollgruppe mit durchschnittlich $22,0 \pm 1,4$ mmHg erkennen. Im venösen Blut blieb der Druck ähnlich hoch bei LLC1-induzierten und nicht-induzierten Mäusen ($29,6 \pm 2,9$ mmHg vs. $25,3 \pm 2,7$ mmHg).

Im venösen Blut wurde, nach 18-tägiger Krebserkrankung, mit einem durchschnittlichen Wert von $33,4 \pm 2,5$ mmHg ein signifikant verringerter Sauerstoffpartialdruck bei den Krebsmäusen in Relation zu den Kontrollmäusen offenkundig ($42,0 \pm 1,9$ mmHg; $p < 0,05$) (Siehe Abb. 3.6 (C)).

3.1.1.4 Histologische Auswertung

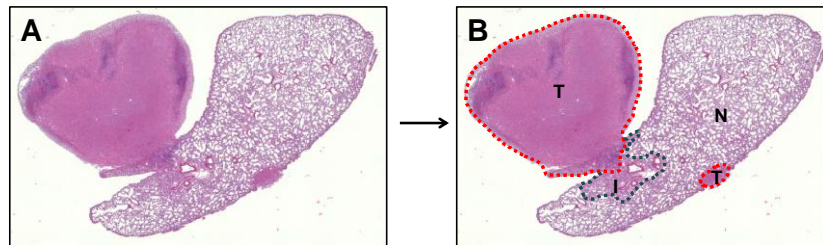


Abbildung 3.7: Histologische Übersichtsaufnahme eines repräsentativen Lungenschnitts des LLC1-Lungentumormodells (A) mit graphischer Darstellung des Nicht-Tumor-Areals und Tumor-Areals (B)

T: Tumormasse. **I:** verdichtetes Lungengewebe. **T+I:** Tumor-Areal. **N:** Nicht-Tumor-Areal. (Hämatoxylin-Eosin, Mosaikaufnahme).

Nach Hämatoxylin-Eosin gefärbte Lungenschnitte des LLC1-Lungentumormodells wiesen multiple, z.T. großflächige und konfluierende Tumoren auf, meist zu Ungunsten des gesunden, unbeteiligten Lungengewebes. Bildung von Neointima und plexiformer Läsionen, als charakteristische Merkmale der idiopathischen pulmonalarteriellen Hypertonie, fanden nicht statt.

Mediale Wandstärke

Bei den kleinen Pulmonalgefäßen (Abb. 3.8 (A)) lag die mediale Wandstärke in der gesunden Kontrollgruppe bei $11,84 \pm 0,35 \%$ und im Nicht-Tumor-Areal bei $12,90 \pm 0,62 \%$. An Lungenadenokarzinomen erkrankte Tiere zeigten in ihrem Tumor-Areal eine signifikante Erhöhung mit durchschnittlichen Werten von $16,00 \pm 0,74 \%$ ($p < 0,001$ vs. gesunde Kontrollen. $p < 0,01$ vs. Nicht-Tumor-Areal).

Wie aus Abb. 3.8 (B) ersichtlich, konnte für die mittleren Gefäße ebenfalls ein deutlicher Anstieg bei den sich im Tumor-Areal befindlichen Pulmonalgefäßen verzeichnet werden ($8,47 \pm 1,65 \%$) im Verhältnis zu denen im unbeteiligten Part der Lunge ($6,80 \pm 0,69 \%$; $p < 0,01$) und in den gesunden Kontrolllungen ($6,10 \pm 0,74 \%$; $p < 0,001$).

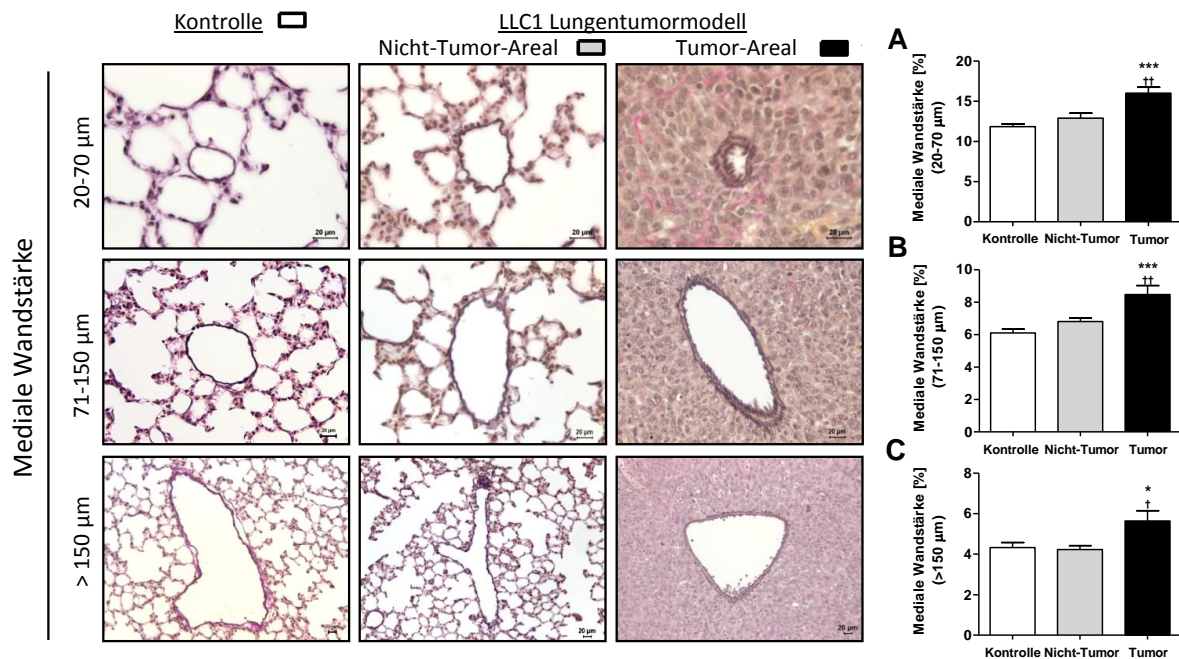


Abbildung 3.8: Färbung und Graphen zur Darstellung der mittleren Wandstärke von Pulmonalgefäßen im LLC1-Lungentumormodell

Berücksichtigt wurden Gefäße mit einem externen Durchmesser von (A) 20-70 µm (n=9-10), (B) 71-150 µm (n=9-10) und (C) >150 µm (n=7-10). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ – vs. gesunde Kontrollen. † $p < 0,05$, †† $p < 0,01$ – vs. Nicht-Tumor-Areal.

Paraffin-Lungengewebsgeschitte wurden nach Elastica-van Gieson gefärbt, um die Wandstärke der Pulmonalgefäße zu bestimmen. Gezeigt werden repräsentative Aufnahmen von Lungengewebschnitten aus gesunden Kontrolltieren, dem Nicht-Tumor-Areal und dem Tumor-Areal der LLC1-Lungentumormäuse. (Elastica-van Gieson, Originalvergrößerung x630 bei 20-70 µm, x400 bei 71-150 µm, x200 bei >150 µm).

Gleiches stellte sich bei der Betrachtung der großen Gefäßkategorie heraus, bei der die Gefäße des Tumor-Areals mit durchschnittlichen erhöhten Werten von $5,64 \pm 1,53$ % sich deutlich von denen des Nicht-Tumor-Areals ($4,23 \pm 0,51$ %; $p < 0,05$) und der Kontroll-Mäuse unterschieden haben ($4,32 \pm 0,80$ %; $p < 0,05$) (Abb. 3.8 (C)).

In allen drei Gefäßgruppen wurden keine signifikanten Veränderungen der medialen Wandstärke zwischen den Gefäßen der gesunden Kontrolllungen und des Nicht-Tumor-Areals festgestellt.

Muskularisierungsgrad

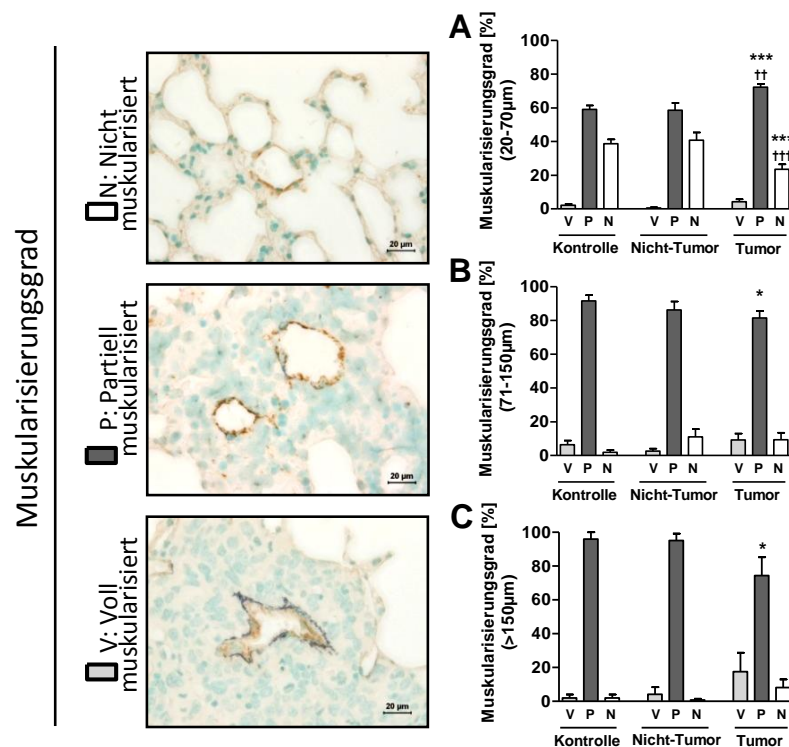


Abbildung 3.9: Färbung und Graphen zur Darstellung des Muskularisierungsgrads von Pulmonalgefäßen im LLC1-Lungentumormodell

Berücksichtigt wurden Gefäße mit einem externen Durchmesser von (A) 20-70 µm (n=9-10), (B) 71-150 µm (n=9-10) und (C) >150 µm (n=8-10). *p<0,05, ***p<0,001 – vs. gesunde Kontrollen. ††p<0,01, †††p<0,001 – vs. Nicht-Tumor-Areal.

Paraffin-Lungengewebsschnitte wurden anhand einer immunhistochemischen Doppelfärbung gegen den endothelialen von Willebrand-Faktor und das glattmuskuläre α-Aktin gefärbt, um den Muskularisierungsgrad der Pulmonalgefäße zu bestimmen. Gezeigt werden repräsentative Aufnahmen von Lungengewebsschnitten aus gesunden Kontrolltieren, dem Nicht-Tumor-Areal und dem Tumor-Areal der LLC1-Lungentumormäuse. (Anti-α-Aktin/vWF-Doppelfärbung, Originalvergrößerung x630).

In der Gefäßkategorie von 20-70 µm wurden bei den uninduzierten C67Bl/6N-Kontrollmäusen $2,24 \pm 0,65$ % voll muskularisierte, $59,0 \pm 2,4$ % partiell muskularisierte und $38,8 \pm 2,6$ % nicht muskularisierte Lungengefäße erfasst. Gefäße im Nicht-Tumor-Areal wiesen mit Werten von $0,58 \pm 0,34$ % voll muskularisierter, $58,6 \pm 4,3$ % teil-muskularisierter und $40,8 \pm 4,5$ % nicht-

muskularisierte Erscheinung eine vergleichbare Verteilung auf. Nach 18-tägiger Krebsentwicklung stieg der Anteil der partiell und voll muskularisierten Gefäße z.T. signifikant auf Werte von $72,3 \pm 2,0 \%$ ($p < 0,001$ vs. gesunde Kontrollen. $p < 0,01$ vs. Nicht-Tumor-Areal) bzw. $4,21 \pm 1,49 \%$ an. Der nicht-muskularisierte Anteil sank signifikant auf durchschnittlich $23,6 \pm 2,9 \%$ ($p < 0,001$ vs. gesunde Kontrollen. $p < 0,001$ vs. Nicht-Tumor-Areal) (Abb. 3.9 (A)).

In der mittleren Gefäßkategorie wurden bei den gesunden Kontrollen und dem Nicht-Tumor-Areal $6,45 \pm 2,41 \%$, bzw. $2,71 \pm 1,40 \%$ voll muskularisierte, $91,6 \pm 3,3 \%$ bzw. $86,2 \pm 5,1 \%$ partiell muskularisierte und $1,92 \pm 1,35 \%$, bzw. $11,11 \pm 4,58 \%$ nicht muskularisierte Gefäße analysiert. Tumor beherbergende Mäuse zeigten $9,20 \pm 3,77 \%$ voll muskularisierte, $81,4 \pm 4,2 \%$ signifikant verringerte, partiell muskularisierte ($p < 0,05$ vs. gesunde Kontrollen) und $9,36 \pm 4,19 \%$ nicht-muskularisierte Lungengefäße (Abb. 3.9 (B)).

Wie aus Abb. 3.9 (C) ersichtlich, blieb der Anteil nicht muskularisierter, über $150 \mu\text{m}$ großer Gefäße in allen Untersuchungsgruppen gering. So betrug dieser Wert bei den gesunden Kontrollen $2,00 \pm 2,00 \%$, im Nicht-Tumor-Areal $0,78 \pm 0,78 \%$ und im Tumor-Areal $8,10 \pm 4,82 \%$. Während nicht induzierte C57BL/6N-Mäuse und Nicht-Tumor-Areal ähnliche Anteile partiell muskularisierter ($96,0 \pm 4,0 \%$, bzw. $95,1 \pm 4,1 \%$) und voll muskularisierter Gefäßen ($2,00 \pm 2,00 \%$, bzw. $4,17 \pm 4,17 \%$) aufwiesen, zeigten die Lungenkrebsmäuse eine signifikante Verschiebung von weniger teil-muskularisierten ($74,3 \pm 10,9 \%$) ($p < 0,05$ vs. gesunde Kontrollen) hin zu mehr voll muskularisierten Gefäßen ($17,6 \pm 11,2 \%$).

Signifikante Unterschiede zwischen den Gefäßen der gesunden Kontrolllungen und des Nicht-Tumor-Areals wurden nicht nachgewiesen.

Gesamtkollagengehalt des rechten Ventrikels

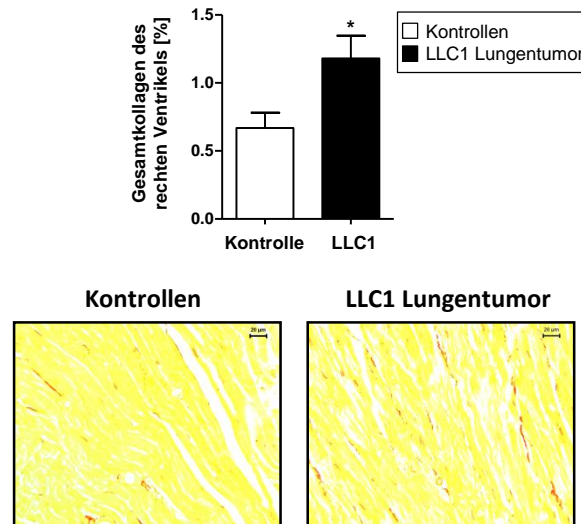


Abbildung 3.10: Färbung und Graphen zur Darstellung des prozentualen Kollagengehalts des rechten Ventrikels im LLC1-Lungentumormodell (n=10) im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (n=9)

Paraffinschnitte des rechten Ventrikels wurden mit Sirius Red gefärbt, um den Kollagengehalt zu bestimmen. Gezeigt werden repräsentative Aufnahmen des Myokards des rechten Ventrikels aus gesunden Kontrolltieren und aus LLC1-Lungentumormäusen. (Sirius Red, Originalvergrößerung x400). * $p < 0,05$ – vs. gesunde Kontrollen.

Die rechten Ventrikel der Adenokarzinomen beherbergenden Mäuse zeigten, mit im Mittel $1,18 \pm 0,17$ %, einen signifikant erhöhten Anteil des Gesamtkollagens an der ausgemessenen Fläche im Vergleich zu den rechten Ventrikeln gesunder Tiere ($0,67 \pm 0,11$ %; $p < 0,05$). Der vorliegende Parameter der Messung des Gesamtkollagens bewies somit Umbauprozesse des rechten Ventrikels infolge verstärkter Belastung.

3.1.2 K-ras^{LA2}-Lungentumormodell

3.1.2.1 Allgemeinbefinden und klinische Befunde

K-ras^{LA2} Knock-in-Mäuse mit C67BL/6 Hintergrund wurden während des Versuchs mit gleichaltrigen, gesunden C57BL/6N-Mäusen verglichen. Bis zum 3. Monat entwickelten sich beide Linien identisch. Danach hingegen zeigten die K-ras^{LA2}-Mäuse geringere Zuwachsraten, wobei ab 4,5 Monaten das Gewicht im Schnitt sogar um $0,8 \pm 0,7$ g sank. Ab dem dritten Lebensmonat verzeichneten die Onkogen-überexprimierenden Mäuse bis Versuchsende eine durchschnittliche Gewichtszunahme von $3,7 \pm 4,9$ %. Gesunde Kontrollen steigerten jedoch im gleichen Zeitraum ihr Gewicht um $15,5 \pm 1,1$ %.

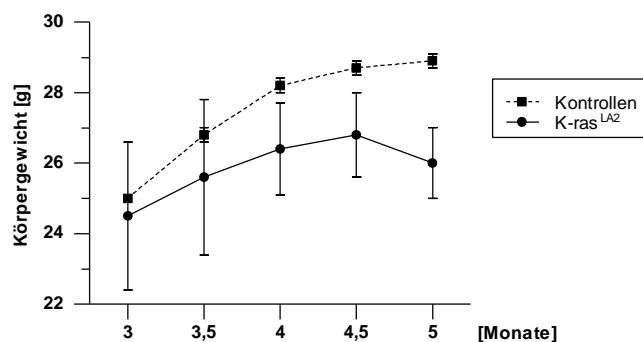


Abbildung 3.11: Verlaufsdarstellung des Mausgewichts im K-ras^{LA2}-Lungentumormodell

Das Gewicht von K-ras^{LA2} Knock-in-Mäusen wird verglichen mit dem gleichaltriger C57BL/6N-Mäusen des gleichen genetischen Hintergrunds von Versuchsbeginn mit 3 Monaten bis Versuchsende mit 5 Monaten.

Das Allgemeinbefinden der K-ras^{LA2}-Mäuse war bis wenige Wochen vor Ende des Versuchs ungetrübt. Dabei manifestierten sich zunehmend erhöhte Atemfrequenzen mit leicht abdominalen Betonung und Bewegungseinschränkung. Vorzeitig aus dem Versuch ausscheidende Tiere traten nicht auf. Multiple, noduläre und abgegrenzte Neoplasien der Lunge waren in 100 % der heterozygoten Knock-in-Mäuse vorhanden. Zusätzlich entwickelten 2 von 10

Mäusen ein Thymuslymphom. Eine dieser 2 Mäuse verstarb während der, der hämodynamischen Messung vorangehenden, Anästhesie.

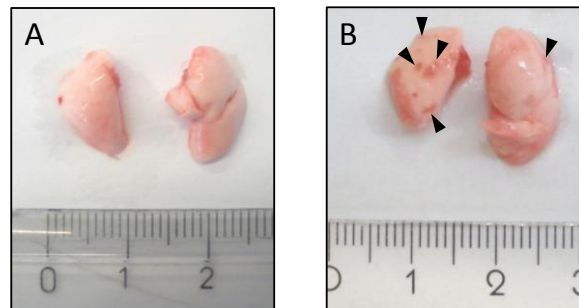


Abbildung 3.12: Makroskopische Lungenaufnahme des K-ras^{LA2}-Lungentumormodells

K-ras^{LA2}-Mäuse entwickelten multiple isolierte, noduläre Adenokarzinome der Lunge (B), wobei die gesunden Kontrolllungen unverändert erschienen (A). **Pfeilspitzen** zeigen die Neoplasien an.

3.1.2.2 Echokardiographie

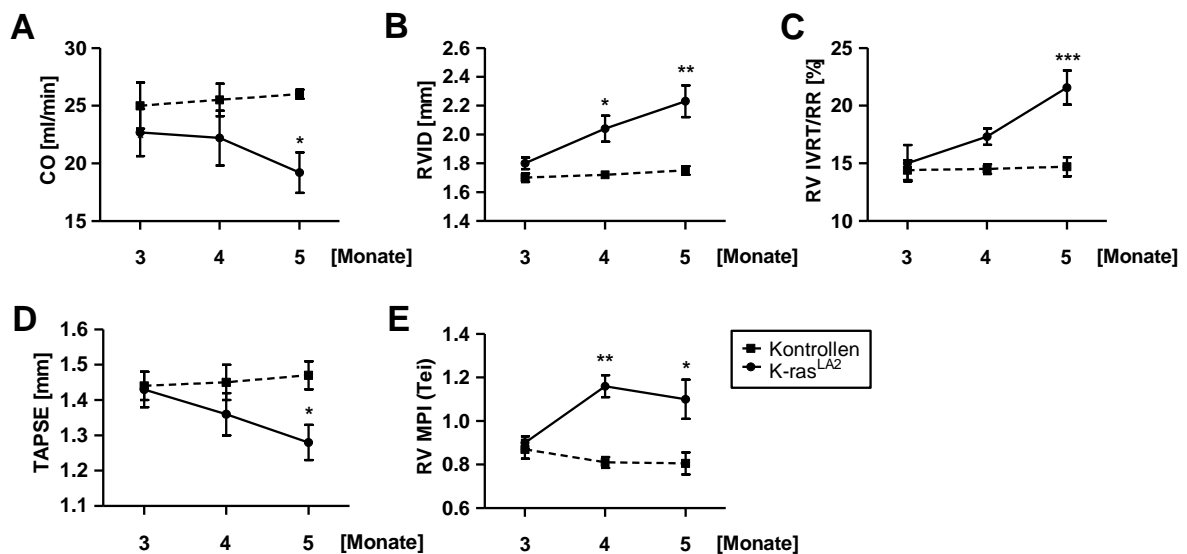


Abbildung 3.13: Graphische Verlaufsdarstellung der echokardiographisch erhobenen Parameter des K-ras^{LA2}-Lungentumormodells im Vergleich zu gleichaltrigen gesunden Kontrollen nach 3, 4 und 5 Lebensmonaten

(A) CO: Herzminutenvolumen (n=5-10). (B) RVID: Innerer Durchmesser des rechten Ventrikels (n=5-10). (C) RV IVRT/RR: isovolumetrische Relaxationszeit (n=5-10). (D) TAPSE: systolische Bewegung des Trikuspidalanulus (n=5-10). (E) RV MPI: Myokardialer Leistungsindex des rechten Ventrikels (n=5-10). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 – vs. gesunde Kontrollen.

Cardiac Output

Bereits zu Beginn des Versuchs mit 3 Monaten zeigten K-ras^{LA2}-Mäuse ein vermindertes Herzminutenvolumen von durchschnittlich $22,7 \pm 2,0$ ml/min. Dieses verschlechterte sich progredient nach einem Monat auf $22,2 \pm 2,4$ ml/min, um mit 5 Monaten lediglich $19,2 \pm 1,7$ ml/min zu betragen. Der Cardiac Output der gesunden Kontrolltiere hingegen stieg von $25,0 \pm 2,0$ ml/min mit 3 Monaten über $25,5 \pm 1,4$ ml/min nach 4 Monaten auf einen durchschnittlichen Wert von $26,0 \pm 0,4$ ml/min (Siehe Abb. 3.13 (A)). Ein signifikanter Abfall des Cardiac Output der Tumoren beherbergenden Mäuse gegenüber gesunden Kontrolltieren wurde nach Erreichen des 5. Lebensmonats verzeichnet ($22,2 \pm 2,4$ ml/min vs. $26,0 \pm 0,4$ ml/min; $p < 0,05$). Der Cardiac Output registrierte somit eine stetig abfallende Pumpleistung des Herzens, je weiter sich die Neoplasien in den Lungentumor-modellen entwickelten.

Innerer Durchmesser des rechten Ventrikels

K-ras^{LA2} Adenokarzinome beherbergende Mäuse kennzeichneten sich zu Beginn des Versuchs mit durchschnittlich $1,80 \pm 0,04$ mm durch einen ähnlich großen rechten Ventrikel aus, wie die gesunden Kontrolltiere mit $1,70 \pm 0,03$ mm (Siehe Abb. 3.13 (B)). Im weiteren Verlauf trat jedoch bei dem K-ras^{LA2}-Lungentumormodell ein signifikant vergrößerter rechter Ventrikel auf, im Vergleich zu den C57BL/6N-Wildtypen ($2,04 \pm 0,09$ vs. $1,72 \pm 0,02$ mm; $p < 0,05$). Diese signifikante Rechtsherzdilatation steigerte sich bis zum Ende des Versuchs mit 5 Monaten. Zu diesem Zeitpunkt entwickelten die Lungenkrebsmäuse einen internen Durchmesser des rechten Ventrikels von $2,23 \pm 0,11$ mm, wohingegen der rechte Ventrikel der gesunden Kontrollen signifikant geringere Weiten aufwies ($1,75 \pm 0,03$ mm; $p < 0,01$). Folglich zeigten K-ras^{LA2} Knock-in-Mäuse mit steigender Tumorlast eine signifikante Rechtsherzdilatation.

Isovolumetrische Relaxationszeit des rechten Ventrikels

K-ras^{LA2}-Mäuse und gesunde Kontrollen boten nach dem 3. Lebensmonat eine ähnliche diastolische Funktion des rechten Ventrikels dar ($15,0 \pm 1,6$ % vs. $14,4 \pm 0,9$ %). Im weiteren Verlauf der tierexperimentellen Studie traten in der zu

untersuchenden Lungenkrebsgruppe signifikant verlängerte isovolumetrische Relaxationszeiten auf. Während sich nach 4 Monaten bei den K-ras^{LA2} Knock-in-Tieren eine erhöhte IVRT/RR von $17,3 \pm 0,7 \%$ dokumentieren ließ, im Verhältnis zu den Kontrolltieren ($14,5 \pm 0,4 \%$), wuchs dieser zeitliche Unterschied zu Versuchsende auf einen signifikanten Wert an ($21,6 \pm 1,5 \%$ vs. $14,7 \pm 0,8 \%$; $p < 0,001$). Ab dem 5. Monat zeugte das K-ras^{LA2}-Lungentumormodell daher von einer signifikant beeinträchtigten diastolischen Relaxationsfähigkeit des rechten Ventrikels (Siehe Abb. 3.13 (C)).

TAPSE - Systolische Bewegung des Trikuspidalanulus

Die systolische Bewegung des Trikuspidalanulus, als Maß für die systolische Kontraktionsfähigkeit des rechten Ventrikels, stellte sich nach 3 Monaten analog bei den Kras^{LA2}-Mäusen ($1,43 \pm 0,05$ mm) und den C57BL/6N-Kontrollen ($1,44 \pm 0,04$ mm) dar (Siehe Abb. 3.13 (D)). Anschließend nahm die durchgeführte Bewegung des Trikuspidalanulus bei der Lungenkrebsgruppe ab, auf Werte von $1,36 \pm 0,06$ mm nach 4 Monaten und von $1,28 \pm 0,05$ mm nach Erreichen des 5. Monats. In den gesunden Kontrollgruppen stieg dieses Maß für die systolische Funktion leicht an ($1,45 \pm 0,05$ mm nach 4 Monaten, $1,47 \pm 0,04$ mm nach 5 Monaten). Die signifikante Abnahme der systolischen Bewegung des Trikuspidalanulus bei den Adenokarzinome beherbergenden Mäusen im Vergleich zu den gesunden Kontrollen ($1,28 \pm 0,05$ mm vs. $1,47 \pm 0,04$ mm; $p < 0,05$) zeugte von einer Beeinträchtigung der systolischen Kontraktionsfähigkeit im Lungenkrebsendstadium.

Myokardialer Leistungsindex des rechten Ventrikels

Zur Beurteilung der globalen Funktion des rechten Ventrikels erfolgte nach 3 Monaten die Messung des RV MPI bei K-ras^{LA2}-Mäusen ($0,90 \pm 0,03$) und gesunden C57BL/6N ($0,87 \pm 0,04$). Nach 4 Monaten nahm dieser Parameter bei der kranken Untersuchungsgruppe signifikant zu im Verhältnis zu den Wildtypen ($1,16 \pm 0,05$ vs. $0,81 \pm 0,03$; $p < 0,01$). Dieses signifikante Ansteigen des RV MPI bei an Lungenkrebs leidenden Mäuse blieb im Vergleich zu der Kontrollgruppe ebenfalls nach 5 Monaten bestehen ($1,10 \pm 0,09$ vs. $0,81 \pm 0,05$; $p < 0,05$). Somit

wurde der Beweis erbracht, dass sich, im Verlauf des Versuchs, eine beeinträchtigte globale Funktion des rechten Ventrikels bei den erkrankten Mäusen entwickelte (Siehe Abb. 3.13 (E)).

3.1.2.3 Invasive Untersuchung

Rechtsventrikulärer systolischer Druck, systemisch arterieller Druck und totaler pulmonaler Widerstand

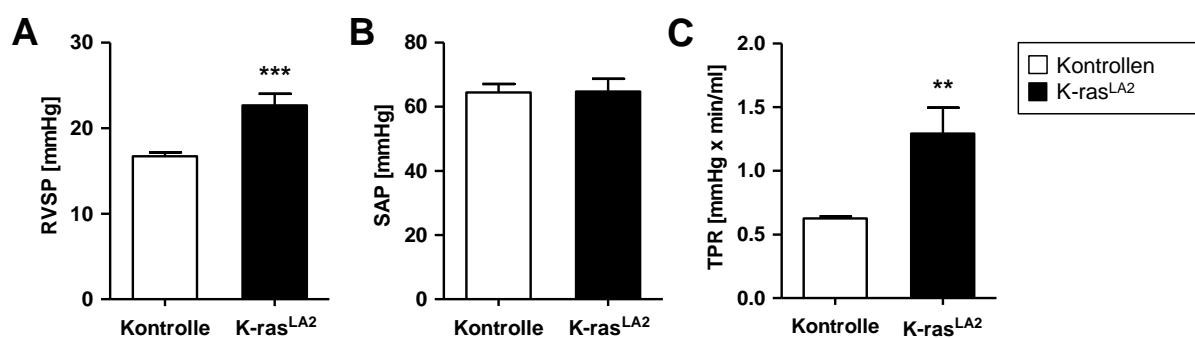


Abbildung 3.14: Graphische Darstellung der während der invasiven Untersuchung erhobenen Drücke beim K-ras^{LA2}-Lungentumormodell

(A) RVSP: Rechtsventrikulärer systolischer Druck (n=9-10). (B) SAP: Systemisch arterieller Druck (n=9-10). (C) TPR: Totaler pulmonaler Widerstand (n=8-9). **p<0,01, ***p<0,001 – vs. gesunde Kontrollen.

Nach 5 Monaten konnte, mittels hämodynamischer Messung, eine signifikante Erhöhung des rechtsventrikulären systolischen Drucks bei K-ras^{LA2} Knock-in-Mäusen mit $22,7 \pm 1,4$ mmHg im Verhältnis zur gesunden Kontrollgruppe mit einem Druck von $16,7 \pm 0,5$ mmHg dokumentiert werden ($p<0,001$) (Siehe Abb. 3.14 (A)).

Der systemisch arterielle Druck verhielt sich nach 5 Monaten sowohl bei den Adenokarzinom-beherbergenden Mäusen ($64,8 \pm 3,1$ mmHg) als auch bei den gesunden C57BL/6N-Kontrollen ($64,5 \pm 2,6$ mmHg) unverändert (Abb. 3.14 (B)).

Das Verhältnis des rechtsventrikulären systolischen Drucks zum Herzminutenvolumen wies mit $1,29 \pm 0,20$ mmHg x min/ml nahezu eine signifikante Verdopplung bei K-ras^{LA2}-Mäuse im Verhältnis zu der gesunden Kontrollgruppe mit $0,63 \pm 0,02$ mmHg x min/ml ($p<0,01$) auf (Abb. 3.14 (C)).

Rechtsherzhypertrophie und Hämatokrit

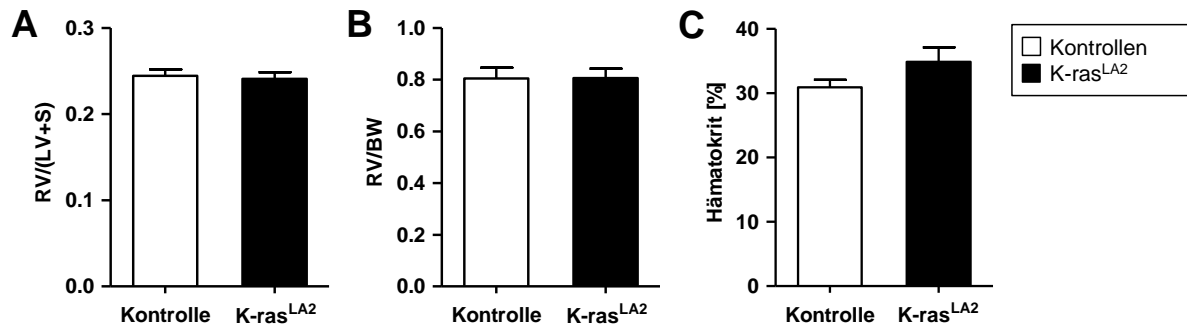


Abbildung 3.15: Graphische Darstellung der Parameter der Rechtsherzhypertrophie und des Hämatokrits beim K-ras^{LA2}-Lungentumormodell

(A) RV/(LV+S): Gewichtsverhältnis zwischen rechtem Ventrikel und linkem Ventrikel plus Septum (n=9-10). (B) RV/BW: Gewichtsverhältnis zwischen rechtem Ventrikel und Körpergewicht (n=10). (C) Hämatokrit (n=9-10).

Weder im Vergleich zum Gewicht des linken Ventrikels plus Septum, noch zum Körpergewicht, konnte ein erhöhtes Gewicht des rechten Ventrikels der Krebsmäuse nachgewiesen werden. So verhielt sich der RV/(LV+S) in Kras^{LA2}-Mäusen ($0,24 \pm 0,01$) entsprechend dem der gesunden Kontrollen ($0,24 \pm 0,01$), wie zu sehen aus Abb. 3.15 (A). Das Gewichtsverhältnis des rechten Ventrikels und des gesamten Körpers blieb ebenfalls konstant bei Werten von $0,81 \pm 0,04$ bei der Lungenkrebsgruppe und $0,81 \pm 0,04$ bei der gleichaltrigen Kontrollgruppe (Siehe Abb. 3.15 (B)).

Schließlich ließen sich aus der Abb. 3.15 (C) keine signifikanten Unterschiede im Hämatokrit transgener Mäus im Vergleich zu den C57BL/6N erkennen ($34,9 \pm 2,3$ mmHg vs. $30,9 \pm 1,2$ mmHg).

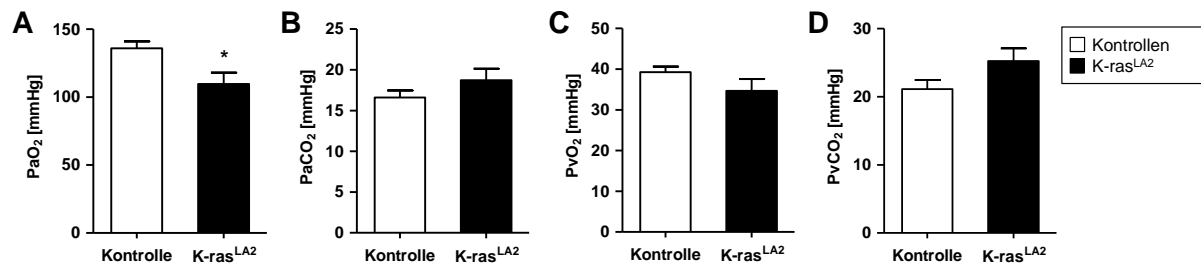
Blutgase

Abbildung 3.16: Graphische Darstellung der während der invasiven Untersuchung erhobenen Blutgase beim K-ras^{LA2}-Lungentumormodell

(A) P_aO₂: Sauerstoffpartialdruck im arteriellen Blut (n=8-10). (B) P_aCO₂: Kohlenstoffdioxidpartialdruck im arteriellen Blut (n=8-10). (C) P_vO₂: Sauerstoffpartialdruck im venösen Blut (n=8). (D) P_vCO₂: Kohlenstoffdioxidpartialdruck im arteriellen Blut (n=8-10). *p<0,05 – vs. gesunde Kontrollen.

Wie ersichtlich in Abb. 3.16 (A), fällt der Sauerstoffpartialdruck im arteriellen Blut während der 3-monatigen Tumorentwicklung mit $109,7 \pm 8,4$ mmHg deutlich im Vergleich zu genetisch unmodifizierten C57BL/6N-Kontrolltieren ab ($135,9 \pm 5,1$ mmHg; $p < 0,01$).

Der arterielle Kohlenstoffdioxidpartialdruck aus Abb. 3.16 (B) bleibt über diesen Zeitraum bei erkrankter und gesunder Gruppe ähnlich konstant ($18,7 \pm 1,4$ mmHg vs. $16,6 \pm 0,9$ mmHg).

Zudem kann ein leichtes Absinken des Sauerstoffpartialdrucks im venösen Blut bei den Versuchstieren mit Adenokarzinomen mit durchschnittlich $34,6 \pm 2,9$ mmHg, im Verhältnis zu den gesunden, gleichaltrigen Kontrollen mit $39,2 \pm 1,4$ mmHg, verzeichnet werden (Siehe Abb. 3.17 (C)).

Wie aus Abb. 3.16 (D) zu ersehen, zeigt P_vCO₂ hingegen einen leichten Anstieg bei den Lungenkrebsmäusen im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren ($25,2 \pm 1,9$ mmHg vs. $21,1 \pm 1,3$ mmHg).

3.1.2.4 Histologische Auswertung

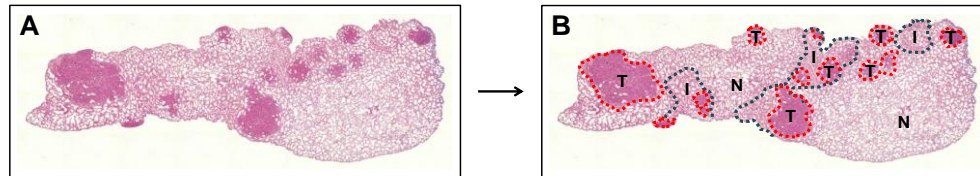


Abbildung 3.17: Histologische Übersichtsaufnahme eines repräsentativen Lungenschnitts des K-ras^{LA2}-Lungentumormodells (A) mit graphischer Darstellung der Einteilung in Nicht-Tumor-Areal und Tumor-Areal (B)

T: Tumormasse. I: verdichtetes Lungengewebe. T+I: Tumor-Areal. N: Nicht-Tumor-Areal. (Hämatoxylin-Eosin, Mosaikaufnahme).

Die sich beim K-ras^{LA2}-Lungentumormodell darstellenden Tumoren zeugten vielfach von einer geringen Ausdehnung, traten jedoch meist in multipler Form auf. Trotzdem blieb das gesunde Nicht-Tumor-Areal meist in einer ausgeprägten Art vorhanden. Neointima und plexiforme Läsionen konnten nicht detektiert werden.

Mediale Wandstärke

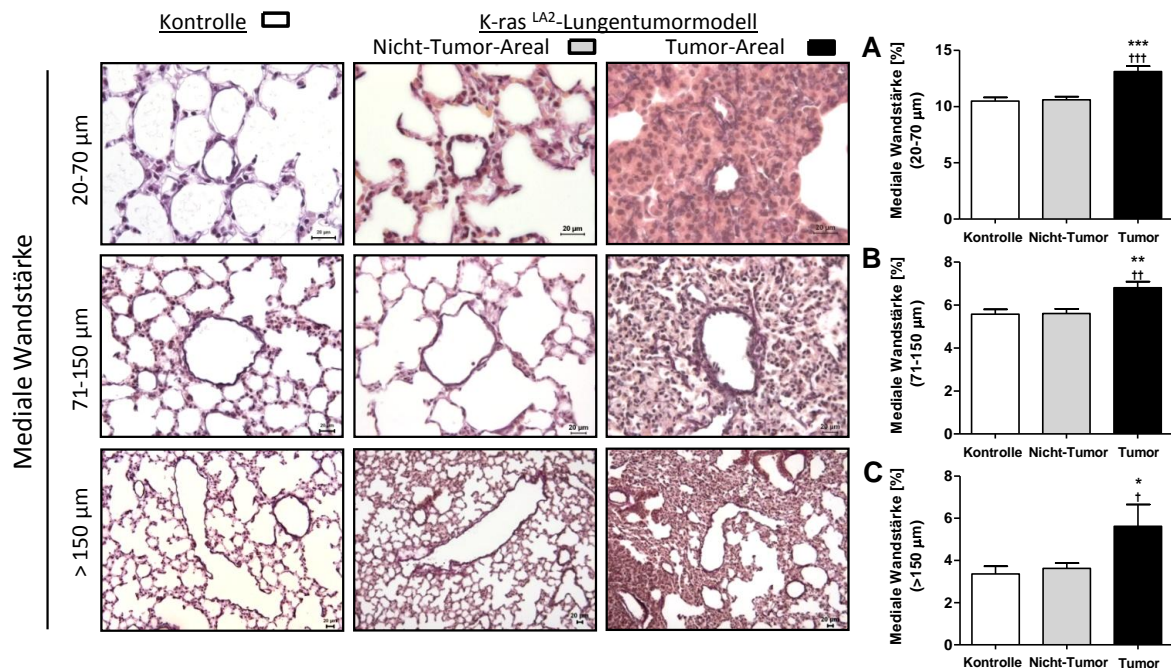


Abbildung 3.18: Färbung und Graphen zur Darstellung der mittleren Wandstärke von Pulmonalgefäßen im K-ras^{LA2}-Lungentumormodell

Berücksichtigt wurden Gefäße mit einem externen Durchmesser von (A) 20-70 μm (n=10), (B) 71-150 μm (n=10) und (C) >150 μm (n=7-8). * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ – vs. gesunde Kontrollen. [†] $p<0,05$, ^{††} $p<0,01$, ^{†††} $p<0,001$ – vs. Nicht-Tumor-Areal.

Paraffin-Lungengewebsschnitte wurden nach Elastica-van Gieson gefärbt, um die Wandstärke der Pulmonalgefäße zu bestimmen. Gezeigt werden repräsentative Aufnahmen von Lungengewebsschnitten aus gesunden Kontrolltieren, dem Nicht-Tumor-Areal und dem Tumor-Areal der K-ras^{LA2} Knock-in-Mäuse. (Elastica-van Gieson, Originalvergrößerung x630 bei 20-70 μm , x400 bei 71-150 μm , x200 bei >150 μm).

Wie aus Abb. 3.18 (A) zu ersehen, verzeichneten die kleinen Gefäße einen signifikanten Anstieg bei den sich im Tumor-Areal befindlichen Pulmonalgefäßen ($13,11 \pm 0,48 \%$) im Verhältnis zu denen im unbeteiligten Part der Tumurlunge ($10,60 \pm 0,28 \%$; $p<0,001$) und denen der gesunden Kontrolllungen ($10,49 \pm 0,32 \%$; $p<0,001$).

Bei den mittleren Pulmonalgefäßen stellte sich die mediale Wandstärke in der gesunden Kontrollgruppe mit $5,57 \pm 0,22 \%$ und im Nicht-Tumor-Areal mit $5,60 \pm 0,22 \%$ dar (Abb. 3.18 (B)). K-ras^{LA2}-Tiere zeigten in ihrem Tumor-Areal eine signifikante Erhöhung mit durchschnittlichen Werten von $6,80 \pm 0,29 \%$ ($p<0,01$ vs. gesunde Kontrollen. $p<0,01$ vs. Nicht-Tumor-Areal).

Wie bei den kleinen und mittleren pulmonalen Gefäßen ließ die große Gefäßkategorie bei den Gefäßen des Tumor-Areals eine durchschnittliche Erhöhung der medialen Wandstärke mit Werten von $5,62 \pm 1,03 \%$, im Verhältnis zu denen des Nicht-Tumor-Areals ($3,62 \pm 0,25 \%$; $p<0,05$) und der C57BL/6N-Kontrolltieren ($3,36 \pm 0,36 \%$; $p<0,05$), erkennen (Abb. 3.18 (C)).

Signifikante Unterschiede zwischen den Gefäßen der gesunden Kontrolllung und des Nicht-Tumor-Areals traten in keiner Gefäßkategorie auf.

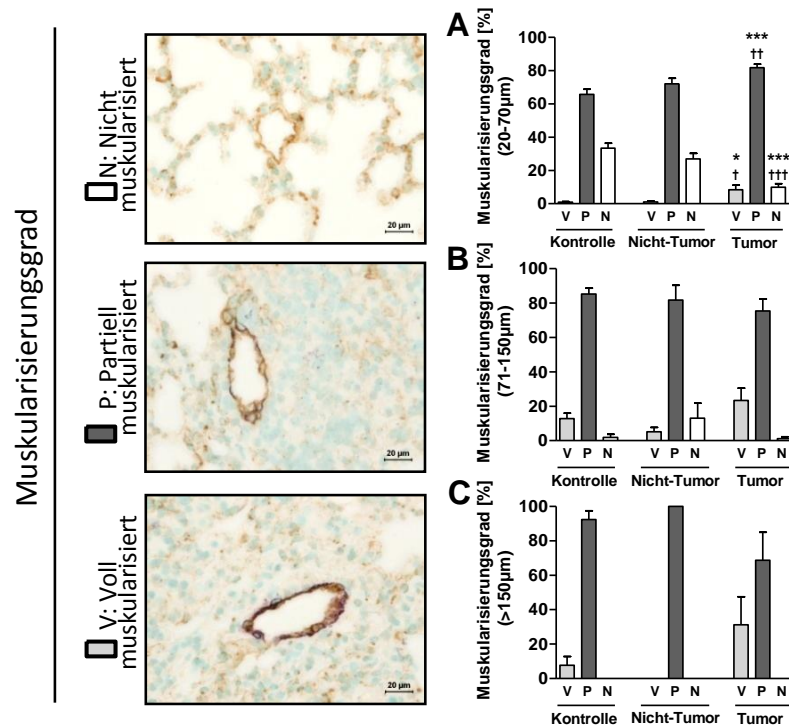
Muskularisierungsgrad

Abbildung 3.19: Färbung und Graphen zur Darstellung des Muskularisierungsgrads von Pulmonalgefäßen im K-ras^{LA2}-Lungentumormodell

Berücksichtigt wurden Gefäße mit einem externen Durchmesser von (A) 20-70 μm (n=10), (B) 71-150 μm (n=9-10) und (C) >150 μm (n=5-8). *p<0,05, ***p<0,001 – vs. gesunde Kontrollen. †p<0,05, ††p<0,01, †††p<0,001 – vs. Nicht-Tumor-Areal.

Paraffin-Lungengewebschnitte wurden anhand einer immunhistochemischen Doppelfärbung gegen den endothelialen von Willebrand-Faktor und das glattmuskuläre α-Aktin gefärbt, um den Muskularisierungsgrad der Pulmonalgefäße zu bestimmen. Gezeigt werden repräsentative Aufnahmen von Lungengewebschnitten aus gesunden Kontrolltieren, dem Nicht-Tumor-Areal und dem Tumor-Areal der K-ras^{LA2} Knock-in-Mäuse. (Anti-α-Aktin/vWF-Doppelfärbung, Originalvergrößerung x630).

In der gesunden Kontrollgruppe, sowie im Nicht-Tumor-Areal bildeten die nicht muskularisierten Gefäße der Kategorie 20-70 μm im Mittel Anteile von 33,3 ± 3,0 %, bzw. 27,0 ± 3,3 %. Beim Tumor-Areal fiel der Anteil nicht muskularisierter Arterien im Verlauf der Erkrankung signifikant ab. So betrug der Anteil nicht muskularisierter Gefäße 9,87 ± 2,09 % (p<0,001 vs. gesunde Kontrollen. p<0,001 vs. Nicht-Tumor-Areal). Der Anteil voll muskularisierter und partiell musku-

larisierter Gefäße nahm dagegen signifikant zu. So konnten $8,42 \pm 2,77$ % voll muskularisierte und $81,7 \pm 2,2$ % partiell muskularisierte Gefäße im Tumor-Areal erfasst werden, im Gegensatz zum Nicht-Tumor-Areal, das Werte von $1,03 \pm 0,56$ % ($p < 0,05$) voll bzw. $72,0 \pm 0,3$ % ($p < 0,01$) partiell muskularisierte Gefäße aufwies. In ähnlicher Weise spiegelten in gesunden Kontrolllungen voll muskularisierte und partiell muskularisierte Gefäße Anteile von nur $0,91 \pm 0,33$ % ($p < 0,05$) bzw. $65,8 \pm 3,1$ % ($p < 0,001$) wieder (Abb. 3.19 (A)).

In der mittleren Gefäßkategorie der Abbildung 3.19 (B) führte die Lungenkrebs-erkrankung zu einem leichten Absinken des Anteils partiell muskularisierter Gefäße ($75,5 \pm 6,8$ %) und einem geringem Anstieg der voll muskularisierten Gefäße ($23,4 \pm 7,1$ %), im Vergleich zu gesunden C57BL/6N-Mäusen und dem Nicht-Tumor-Areal. Sowohl gesunde Kontrolltiere, als auch Nicht-Tumor-Areale zeigten für die partiell muskularisierten Gefäße Werte von $85,4 \pm 3,4$ %, bzw. $81,7 \pm 8,7$ % und für voll Muskularisierte $12,83 \pm 3,08$ % bzw. $5,21 \pm 2,55$ %. Nicht-muskularisierte Gefäße blieben während des gesamten Versuchs in allen Gruppen auf einem niedrigen Niveau ($1,82 \pm 1,82$ % bei gesunden Kontrollen; $13,07 \pm 8,74$ % im Nicht-Tumor-Areal und $1,11 \pm 1,11$ % im Tumor-Areal).

Die großen Gefäße mit einem externen Durchmesser von über $150 \mu\text{m}$ zeigten eine sehr heterogene Verteilung: Während keine nicht muskularisierten Gefäße erfasst wurden, nahm der Anteil partiell muskularisierter Gefäße kontinuierlich von Nicht-Tumor-Areal (100 %) über gesunde Kontrolllunge ($92,38 \pm 5,13$ %) zum Tumor-Areal ($68,8 \pm 16,2$ %) ab. Voll muskularisierte Gefäße vollzogen eine leichte Erhöhung im prozentualen Anteil ausgehend vom Nicht-Tumor-Areal (0 %) über die Kontrolllungen ($7,62 \pm 5,13$ %) zu dem Tumor-Areal ($31,3 \pm 16,2$ %) (Abb. 3.19 (C)).

In keiner der drei Gefäßgruppen wurden signifikante Veränderungen zwischen den Gefäßen der gesunden Kontrolllungen und des Nicht-Tumor-Areals festgestellt.

Gesamtkollagengehalt des rechten Ventrikels

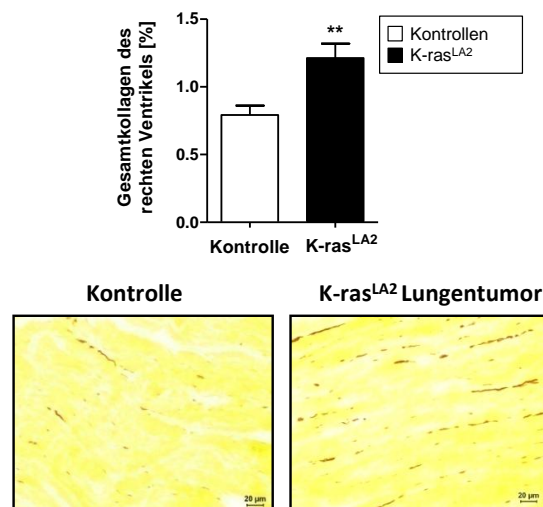


Abbildung 3.20: Färbung und Graphen zur Darstellung des prozentualen Kollagengehalts des rechten Ventrikels im K-ras^{LA2}-Lungentumormodell (n=10) im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (n=10)

Paraffinschnitte des rechten Ventrikels wurden mit Sirius Red gefärbt, um den Kollagengehalt zu bestimmen. Gezeigt werden repräsentative Aufnahmen des Myokards des rechten Ventrikels aus gesunden Kontrolltieren und aus K-ras^{LA2} Knock-in-Mäuse. (Sirius Red, Originalvergrößerung x400). **p<0,01 – vs. gesunde Kontrollen.

K-ras^{LA2}-Mäuse wiesen bei der genaueren Betrachtung des rechten Ventrikels einen signifikanten Anstieg des myokardialen Gesamtkollagengehalts auf im Verhältnis zu den rechten Ventrikeln gesunder Kontrolltiere (1,21 ± 0,11 % vs. 0,79 ± 0,07 %; p<0,01). So kann man von einer erhöhten Belastung des rechten Ventrikels durch das Vorhandensein von Lungentumoren ausgehen.

3.1.3 SP-C-c-raf-BxB-23-Lungentumormodell

3.1.3.1 Allgemeinbefinden und klinische Befunde

SP-C-c-raf-1-BxB-23-Mäuse wurden gegenüber ihren gleichaltrigen, für das Transgen negativen Wurfgeschwistern beurteilt. Bereits zu Versuchsbeginn, mit 7 Monaten, zeigten sich deutliche Unterschiede in den Körpermassen beider Versuchsgruppen. So kennzeichnet sich die gesunde Kontrollgruppe durch ein im Mittel um 30,6 % gesteigertes Körpergewicht nach 7 Monaten. Die sich anschließenden Zuwachsraten vom 7. bis 9. Monat unterschieden sich hingegen wenig. Während die gesunden Wurfgeschwister $3,3 \pm 1,8 \%$ ihres Gewichts zulegten, folgte die Gewichtszunahme der Adenomen-tragenden Tiere von $2,3 \pm 5,2 \%$ dicht dahinter.

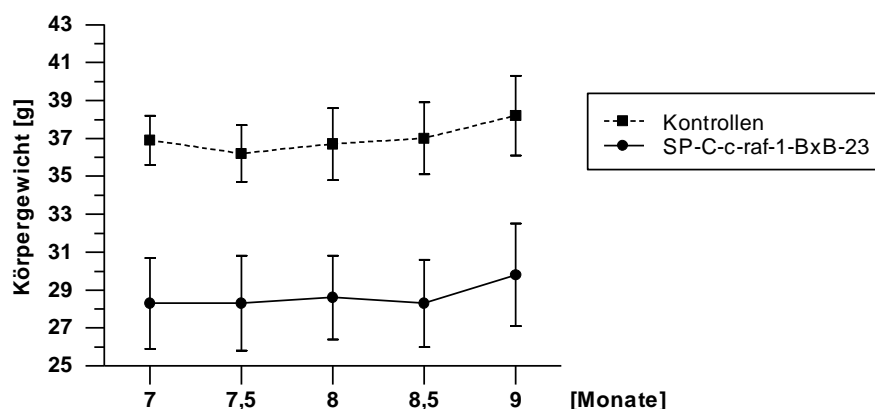


Abbildung 3.21: Verlaufsdarstellung des Mausgewichts im SP-C-c-raf-1-BxB-23-Lungentumormodell

Das Gewicht von SP-C-c-raf-1-BxB-23 transgenen Mäusen wird verglichen mit dem gleichaltrigen, gesunden Wurfgeschwister des gleichen genetischen Hintergrunds von Versuchsbeginn mit 7 Monaten bis Versuchsende mit 9 Monaten.

Das Allgemeinbefinden der transgenen Mäuse stellte sich bis zuletzt als ohne besonderen Befund dar. Dies war ersichtlich aus der bis zum Versuchsende um $0,1 \pm 1 \%$ ansteigenden Körpermasse und deren identischen Gewichtskurven-

verlauf im Verhältnis zur gesunden Kontrollgruppe. Die Tiere nahmen entsprechend ihrem Alter regsam an der Umgebung teil und zeigten artspezifisches Sozialverhalten, sowie einen thorakoabdominalen Atemtyp. Komplikationen traten hingegen bei 2 Mäusen auf, wobei die erste in der letzten echokardiographischen Untersuchung kardiale Arrhythmien aufwies. Klinisch blieb sie jedoch unauffällig, so dass sie im Versuch verbleiben konnte, wohingegen die zweite Maus an epileptischen Anfällen zu leiden schien und daher aus dem Versuch genommen werden musste.

Alle transgenen Tiere ließen multiple, diffuse, unscharf abgegrenzte Tumoren in Lungenflügeln verfestigter, fleischiger Konsistenz erkennen.

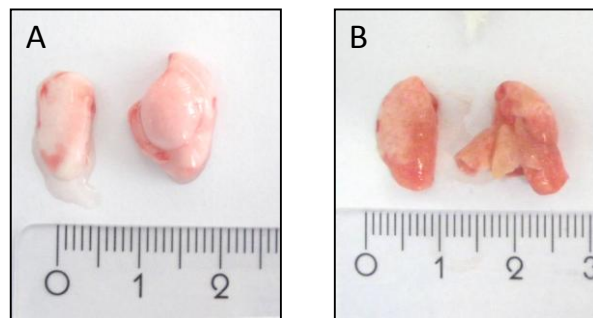


Abbildung 3.22: Makroskopische Lungenaufnahme des SP-C-c-raf-1-BxB-23-Lungentumor-modells

Anders als bei gesunden Kontrolllungen (**A**) wiesen die Lungen der SP-C-c-raf-1-BxB-23 transgenen Mäuse multiple, diffuse unscharf abgegrenzte Tumore, sowie diffus verhärtete Lungenflügel fleischiger Konsistenz auf (**B**).

3.1.3.2 Echokardiographie

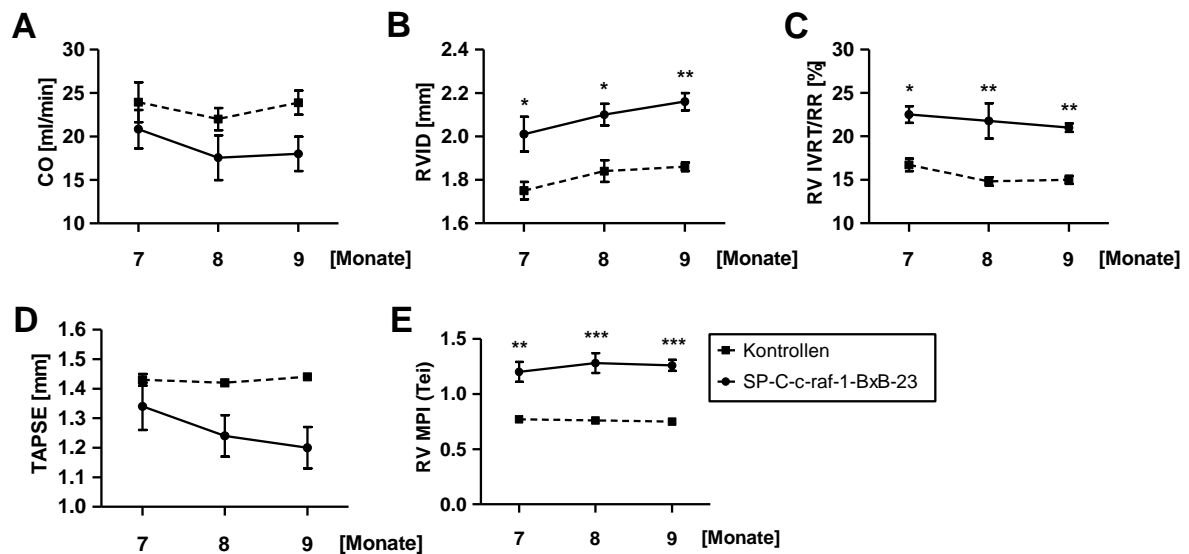


Abbildung 3.23: Graphische VerlaufsDarstellung der echokardiographisch erhobenen Parameter des SP-C-c-raf-1-BxB-23-Lungentumormodells im Vergleich zu gleichaltrigen gesunden Kontrollen nach 7, 8 und 9 Lebensmonaten

(A) CO: Herzminutenvolumen (n=5-9). (B) RVID: Innerer Durchmesser des rechten Ventrikels (n=5-9). (C) RV IVRT/RR: isovolumetrische Relaxationszeit (n=5-9). (D) TAPSE: systolische Bewegung des Trikuspidalanulus (n=5-9). (E) RV MPI: Myokardialer Leistungsindex des rechten Ventrikels (n=5-9). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 – vs. gesunde Kontrollen.

Cardiac Output

SP-C-c-raf-1-BxB-23-Mäuse ließen während der 9-monatigen Dauer des Versuchs ein stetig abnehmendes Herzminutenvolumen erkennen ($20,8 \pm 2,2$ ml/min nach 7 Monaten, $17,6 \pm 2,6$ ml/min nach 8 Monaten), wobei zum Versuchsende hin, nach 9 Monaten, mit durchschnittlichen Werten von $18,0 \pm 2,0$ ml/min ein leichter Anstieg des CO zu verzeichnen war. Einen ähnlichen zeitlichen Verlauf wiesen die gesunden Wurfgeschwister auf, bei denen das Herzzeitvolumen vom 7. bis zum 8. Lebensmonat von $23,0 \pm 2,3$ ml/min auf $22,0 \pm 1,3$ ml/min absank, um anschließend bis zum 9. Monat wieder auf $23,9 \pm 1,4$ ml/min anzusteigen (Siehe Abb. 3.23 (A)). Der Cardiac Output der SP-C-c-raf-1-BxB-23- Mäuse spiegelte daher eine leicht, jedoch nicht signifikant beeinträchtigte Pumpleistung des Herzens im Vergleich zu der Kontrollgruppe wieder.

Innerer Durchmesser des rechten Ventrikels

Von Versuchsbeginn an, bereits bei der ersten echokardiographischen Untersuchung nach 7 Monaten, fielen die signifikant erhöhten internen Durchmesserberechnungen des rechten Ventrikels der SP-C-c-raf-1-BxB-23-Mäuse im Vergleich zu den gesunden Wurfgeschwistern auf ($2,01 \pm 0,08$ mm vs. $1,75 \pm 0,04$ mm; $p < 0,05$). Der weitere Anstieg dieses Parameters bei den Lungenkrebsmäusen führte zum Erhalt und Ausbau dieses signifikanten Unterschieds zwischen SP-C-c-raf-1-BxB-23-Mäusen und der Kontrollgruppe nach 8 Monaten ($2,10 \pm 0,05$ mm vs. $1,84 \pm 0,05$ mm; $p < 0,05$) und 9 Monaten ($2,16 \pm 0,04$ mm vs. $1,86 \pm 0,02$ mm; $p < 0,01$). Mit steigender Tumorlast entwickelte sich somit eine signifikante Rechtsherzdilatation (Siehe Abb. 3.23 (B)).

Isovolumetrische Relaxationszeit des rechten Ventrikels

SP-C-c-raf-1-BxB-23-Mäuse offenbarten zum Zeitpunkt der ersten echokardiographischen Untersuchung nach 7 Monaten, mit durchschnittlich $22,5 \pm 1,0$ %, eine verlängerte Relaxationszeit im Vergleich zu den Kontrolltieren mit $16,7 \pm 0,7$ % (Siehe Abb. 3.23 (C)). Dabei handelte es sich um eine signifikante Erhöhung mit $p < 0,05$. Durch einen zusätzlichen Anstieg dieses Parameters bei den Adenomen beherbergenden Mäusen blieb der signifikante Unterschied zwischen SP-C-c-raf-1-BxB-23-Mäusen und gesunden Wurfgeschwistern über den gesamten Verlauf des Versuchs bestehen (nach 8 Monaten: $21,8 \pm 2,0$ % vs. $14,8 \pm 0,5$ %; $p < 0,05$; nach 9 Monaten: $21,0 \pm 0,5$ % vs. $15,0 \pm 0,5$ %; $p < 0,001$). Das SP-C-c-raf-1-BxB-23-Lungentumormodell manifestierte somit im Zuge fortgeschrittener gutartiger Tumorerkrankung eine signifikant beeinträchtigte diastolische Relaxationsfähigkeit des rechten Ventrikels.

TAPSE - Systolische Bewegung des Trikuspidalanulus

Nach 7 Monaten unterschied sich die systolische Bewegung des Trikuspidalanulus, als Maß für die systolische Kontraktionsfähigkeit des rechten Ventrikels, nur gering zwischen den SP-C-c-raf-1-BxB-23-Mäusen ($1,34 \pm 0,08$ mm) und den gesunden Kontrollen ($1,43 \pm 0,02$ mm) (Siehe Abb. 3.23 (D)). Im weiteren Verlauf verringerte sich die Bewegung des Trikuspidalanulus in der

Lungentumorgruppe auf $1,24 \pm 0,07$ mm nach 8 Monaten, um schließlich bis auf $1,20 \pm 0,07$ mm nach Erreichen des 9. Monats abzufallen. In den gesunden Wurfgeschwistern blieb dieses Maß für die systolische Funktion überwiegend konstant ($1,42 \pm 0,01$ mm nach 8 Monaten, $1,44 \pm 0,01$ mm nach 9 Monaten). Die tendenzielle, jedoch nicht signifikant verminderte Bewegungsfähigkeit des Trikuspidalanulus ließ eine Beeinträchtigung der systolischen Kontraktionsfähigkeit im SP-C-c-raf-1-BxB-23-Lungentumormodell vermuten.

Myokardialer Leistungsindex des rechten Ventrikels

Über den gesamten Versuchsverlauf, vom 7. bis zum 9. Monat, waren signifikante Unterschiede in der globalen, sowohl systolischen wie auch diastolischen, Funktion des rechten Ventrikels zu verzeichnen (Siehe Abb. 3.23 (E)). Die gesunden Wurfgeschwister ließen einen RV MPI von $0,77 \pm 0,02$ nach 7 Monaten, $0,76 \pm 0,02$ nach 8 Monaten und $0,75 \pm 0,02$ nach 9 Monaten erkennen. Dem gegenüber standen die Lungentumor beherbergenden SP-C-c-raf-1-BxB-23-Mäuse mit signifikant erhöhtem Tei-Index: nach 7 Monaten ($1,20 \pm 0,09$; $p < 0,01$), nach 8 Monaten ($1,28 \pm 0,09$; $p < 0,001$), sowie nach 9 Monaten ($1,26 \pm 0,05$; $p < 0,001$). Dies bewies, dass die erkrankten Mäusen sich durch eine beeinträchtigte globale Funktion des rechten Ventrikels kennzeichneten.

3.1.3.3 Invasive Untersuchung

Rechtsventrikulärer systolischer Druck, systemisch arterieller Druck und totaler pulmonaler Widerstand

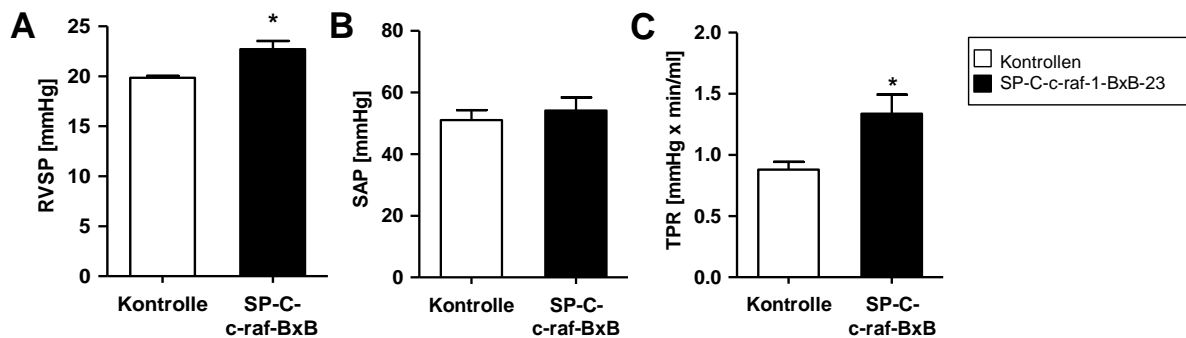


Abbildung 3.24: Graphische Darstellung der während der invasiven Untersuchung erhobenen Drücke beim SP-C-c-raf-1-BxB-23-Lungentumormodell

(A) RVSP: Rechtsventrikulärer systolischer Druck (n=5-7). (B) SAP: Systemisch arterieller Druck (n=5-8). (C) TPR: Totaler pulmonaler Widerstand (n=5-7). * $p < 0,05$ – vs. gesunde Kontrollen.

SP-C-c-raf-1-BxB-23 transgene Mäuse zeigten nach 9 Monaten bei der hämodynamischen Untersuchung einen angestiegenen rechtsventrikulären systolischen Druck von $22,7 \pm 0,8$ mmHg, im Verhältnis zur gesunden Kontrollgruppe mit einem Druck von $19,8 \pm 0,0$ mmHg ($p < 0,05$) (Siehe Abb. 3.24 (A)).

Der systemische arterielle Druck wurde sowohl bei den transgenen Tumormäusen ($54,2 \pm 4,2$ mmHg) als auch bei den gesunden Wurfgeschwistern ($51,1 \pm 3,2$ mmHg) als unverändert dokumentiert (Siehe Abb. 3.24 (B)).

Wie aus Abbildung 3.24 (C) ersichtlich, zeigten die SP-C-c-raf-1-BxB-23-Mäuse einen signifikant erhöhten totalen pulmonalen Widerstand im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe ($1,34 \pm 0,16$ mmHg x min/ml vs. $0,88 \pm 0,06$ mmHg x min/ml ($p < 0,05$)).

Rechtsherzhypertrophie und Hämatokrit

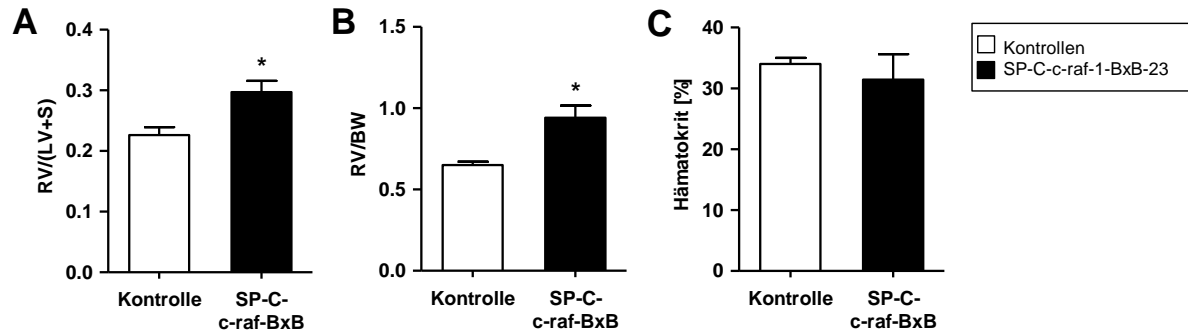


Abbildung 3.25: Graphische Darstellung der Parameter der Rechtsherzhypertrophie und des Hämatokrits beim SP-C-c-raf-1-BxB-23-Lungentumormodell

(A) RV/(LV+S): Gewichtsverhältnis zwischen rechtem Ventrikel und linkem Ventrikel plus Septum (n=5-10). (B) RV/BW: Gewichtsverhältnis zwischen rechtem Ventrikel und Körpergewicht (n=5-10). (C) Hämatokrit (n=5-9). *p<0,05 – vs. gesunde Kontrollen.

Das SP-C-c-raf-1-BxB-23-Lungentumormodell wies einen signifikanten Anstieg des Gewichtsverhältnisses des rechten Ventrikels zum linkem Ventrikel plus Septum ($0,30 \pm 0,02$), im Verhältnis zu den Kontrollen ($0,23 \pm 0,01$ mmHg; $p<0,05$) auf. Eine ähnliche Erhöhung war erkennbar beim Verhältnis RV/BW zwischen erkrankten und gesunden gleichaltrigen Tieren ($0,94 \pm 0,07$ % vs. $0,65 \pm 0,02$ %; $p<0,05$) (Siehe Abb. 3.25 (A) und (B)).

Laut Abb. 3.25 (C), stellte sich der Hämatokrit, wie in den anderen Modellen, unverändert dar, wobei die Adenomen beherbergenden Mäuse Werte von durchschnittlich $31,4 \pm 4,2$ mmHg und gesunde Kontrolltiere einen Hämatokrit von $34,0 \pm 1,0$ mmHg aufwiesen.

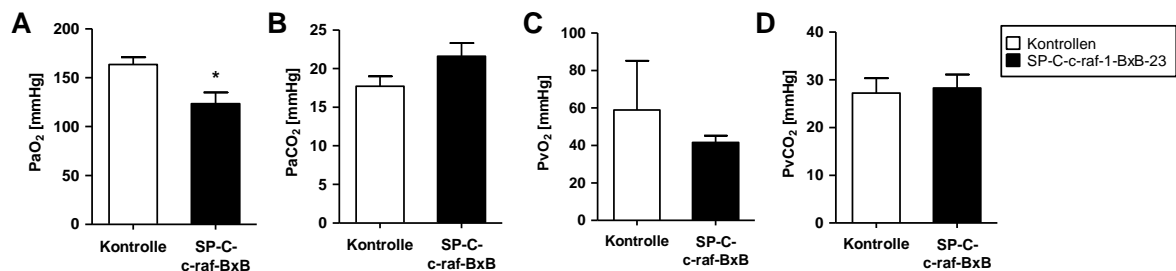
Blutgase

Abbildung 3.26: Graphische Darstellung der während der invasiven Untersuchung erhobenen Blutgase beim SP-C-c-raf-1-BxB-23-Lungentumormodell

(A) P_{aO_2} : Sauerstoffpartialdruck im arteriellen Blut (n=5-9). (B) P_{aCO_2} : Kohlenstoffdioxidpartialdruck im arteriellen Blut (n=5-8). (C) P_{vO_2} : Sauerstoffpartialdruck im venösen Blut (n=5-9). (D) P_{vCO_2} : Kohlenstoffdioxidpartialdruck im venösen Blut (n=5-9). * $p < 0,05$ – vs. gesunde Kontrollen.

Bei der Blutgasanalyse konnten nur signifikante Unterschiede bezüglich des arteriellen Sauerstoffpartialdrucks zwischen Tumor beherbergenden Mäusen und Kontrolltieren nachgewiesen werden (Abb. 3.26 (A)). Dieser sank nach dem 9-monatigen Krankheitsverlauf von $163,5 \pm 7,4$ mmHg bei den gesunden Tieren auf $123,3 \pm 11,6$ mmHg bei den transgenen Tieren ($p < 0,05$).

Wie aus Abb. 3.26 (B) ersichtlich, zeugten die SP-C-c-raf-1-BxB-23-Mäuse von einem im Mittel leicht erhöhten arteriellen Kohlenstoffdioxidpartialdruck ($21,6 \pm 1,7$ mmHg) im Vergleich zu den Kontrolltieren ($17,7 \pm 1,3$ mmHg).

Im venösen Blut zeigte sich der Sauerstoffpartialdruck bei kranken im Verhältnis zu gesunden Mäusen tendenziell erniedrigt ($41,6 \pm 3,6$ mmHg vs. $58,9 \pm 26,3$ mmHg), der Kohlenstoffdioxidpartialdruck blieb jedoch gleich ($28,3 \pm 2,8$ mmHg vs. $27,2 \pm 3,1$ mmHg) (Siehe Abb. 3.26 (C) und (D)).

3.1.3.4 Histologische Auswertung

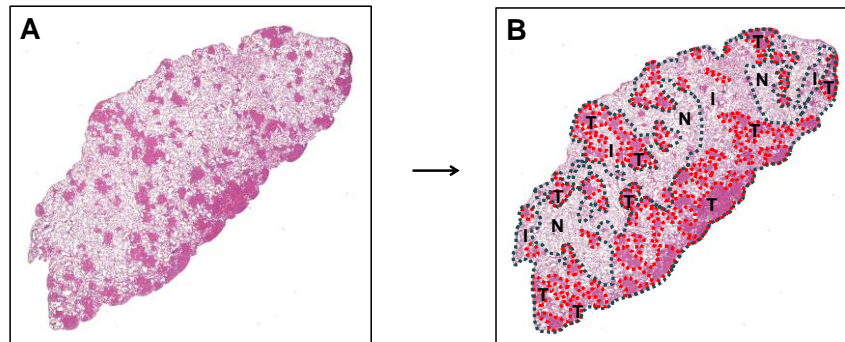


Abbildung 3.27: Histologische Übersichtsaufnahme eines repräsentativen Lungenschnitts des SP-C-c-raf-1-BxB-23-Lungentumormodells (A) mit graphischer Darstellung der Einteilung in Nicht-Tumor-Areal und Tumor-Areal (B)

T: Tumormasse. **I:** verdichtetes Lungengewebe. **T+I:** Tumor-Areal. **N:** Nicht-Tumor-Areal. (Hämatoxylin-Eosin, Mosaikaufnahme).

Die histologische Begutachtung der entnommenen Lungen im SP-C-c-raf-1-BxB-23-Lungentumormodell ergab das Bild einer ausgedehnten Tumorerkrankung mit multiplen Tumorherden und einer im Vergleich zum LLC1- und K-ras^{LA2}-Lungentumormodell ausgeprägten Entzündungsreaktion, insbesondere in dem in Abb. 3.27 als I gekennzeichneten verdichteten Lungengewebe. So wurde hier im Vergleich zum Nicht-Tumor-Areal ein umfangreiches Tumor-Areal nachgewiesen. Neointima und plexiforme Läsionen wurden nicht erfasst.

Mediale Wandstärke

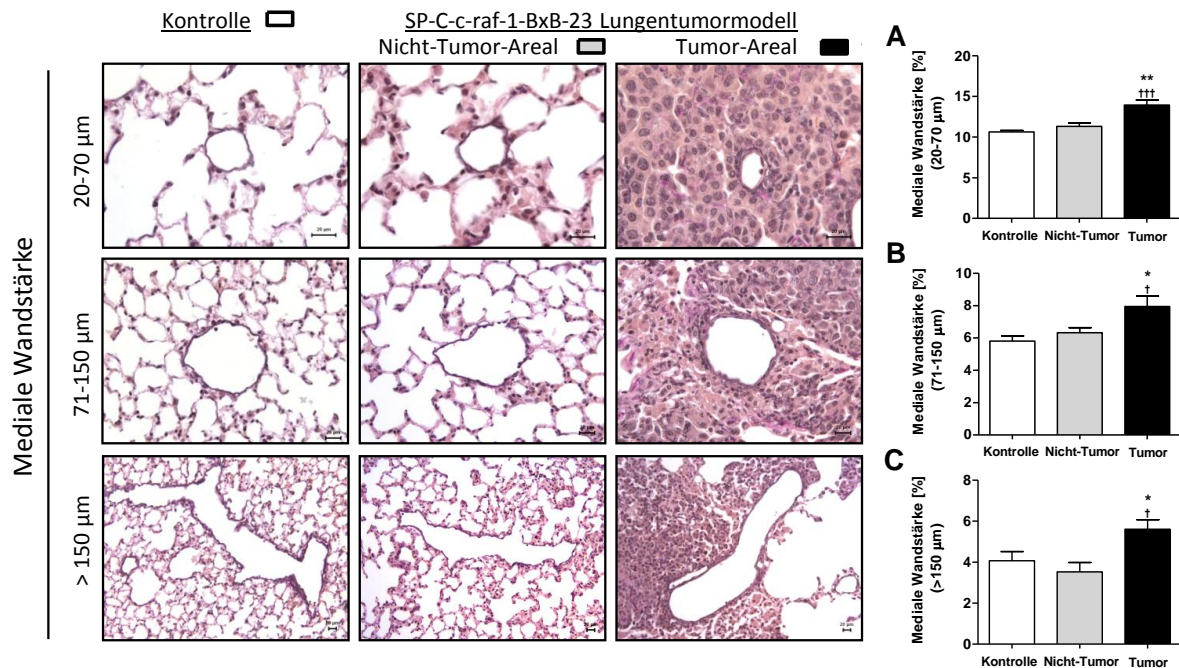


Abbildung 3.28: Färbung und Graphen zur Darstellung der mittleren Wandstärke von Pulmonalgefäßen im SP-C-c-raf-1-BxB-23-Lungentumormodell

Berücksichtigt wurden Gefäße mit einem externen Durchmesser von (A) 20-70 µm (n=5-10), (B) 71-150 µm (n=5-9) und (C) >150 µm (n=5-7). *p<0,05, **p<0,01 – vs. gesunde Kontrollen. †p<0,05, ††p<0,001 – vs. Nicht-Tumor-Areal.

Paraffin-Lungengewebschnitte wurden nach Elastica-van Gieson gefärbt, um die Wandstärke der Pulmonalgefäße zu bestimmen. Gezeigt werden repräsentative Aufnahmen von Lungengewebschnitten aus gesunden Kontrolltieren, dem Nicht-Tumor-Areal und dem Tumor-Areal der SP-C-c-raf-1-BxB-23 transgenen Mäuse. (Elastica-van Gieson, Originalvergrößerung x630 bei 20-70 µm, x400 bei 71-150 µm, x200 bei >150 µm).

Abb. 3.28 (A) verdeutlicht einen signifikanten Anstieg der medialen Wandstärke der kleinen pulmonalen Gefäße im Tumor-Areal ($13,94 \pm 0,63$ %) im Verhältnis zu denen im unbeteiligten Part der Tumurlunge ($11,32 \pm 0,40$ %; $p<0,001$) und in den gesunden Kontrolllungen ($10,64 \pm 0,17$ %; $p<0,01$).

Wie aus Abb. 3.28 (B) zu erkennen, war die mediale Wandstärke der mittleren Gefäße im Tumor-Areal im Durchschnitt mit Werten von $7,94 \pm 0,64$ % signifikant höher als die der Gefäße des Nicht-Tumor-Areals ($6,32 \pm 0,31$ %; $p<0,05$) und der gesunden Wurfgeschwister ($5,81 \pm 0,32$ %; $p<0,05$).

Bei den großen Pulmonalgefäßen stellten sich die medialen Wandstärken der Nicht-Tumor-Gefäße mit einem durchschnittlichen Wert von $3,52 \pm 0,46 \%$ und die der gesunden Kontrollgruppe mit $4,07 \pm 0,45 \%$ dar (Abb. 3.28 (C)). SP-C-c-raf-1-BxB-23-Mäuse zeigten in ihrem Tumor-Areal eine signifikante Erhöhung mit durchschnittlichen Werten von $5,61 \pm 0,46 \%$ ($p < 0,05$ vs. gesunde Kontrollen; $p < 0,05$ vs. Nicht-Tumor-Areal).

In allen Gefäßkategorien verhielt sich die mediale Wandstärke bei den Gefäßen der gesunden Kontrollungen und des Nicht-Tumor-Areal ähnlich.

Muskularisierungsgrad

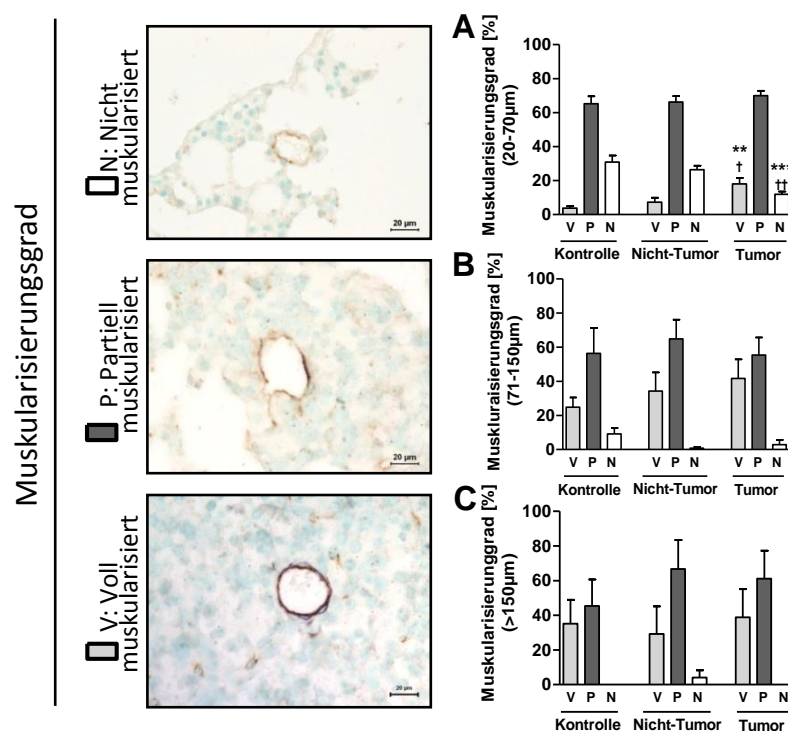


Abbildung 3.29: Färbung und Graphen zur Darstellung des Muskularisierungsgrads von Pulmonalgefäßen im SP-C-c-raf-1-BxB-23-Lungentumormodell

Berücksichtigt wurden Gefäße mit einem externen Durchmesser von (A) 20-70 µm (n=5-10), (B) 71-150 µm (n=5-10) und (C) >150 µm (n=5-9). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ – vs. gesunde Kontrollen. † $p < 0,05$, †† $p < 0,01$ – vs. Nicht-Tumor-Areal.

Paraffin-Lungengewebschnitte wurden anhand einer immunhistochemischen Doppelfärbung gegen den endothelialen von Willebrand-Faktor und das glattmuskuläre α -Aktin gefärbt, um den Muskularisierungsgrad der Pulmonalgefäße zu bestimmen. Gezeigt werden repräsentative Aufnahmen von Lungengewebschnitten aus gesunden Kontrolltieren, dem Nicht-Tumor-Areal und dem Tumor-Areal der SP-C-c-raf-1-BxB-23 transgenen Mäuse. (Anti- α -Aktin/vWF-Doppelfärbung, Originalvergrößerung x630).

Wie aus Abb. 3.29 (A) zu ersehen, zeigten sich, in den Schnitten der gesunden Wurfgeschwister, bei den kleinen pulmonalen Gefäßen zum Großteil nicht muskularisierte ($30,9 \pm 3,8 \%$) und partiell muskularisierte Gefäße ($65,2 \pm 4,3 \%$). Voll muskularisierte Gefäße traten nur zu $3,84 \pm 1,15 \%$ auf. Eine ähnliche Verteilung demonstrierten die Gefäße im Nicht-Tumor-Areal mit $26,4 \pm 2,4 \%$ nicht muskularisierte, $66,3 \pm 3,4 \%$ partiell muskularisierte und $7,33 \pm 2,57 \%$ voll muskularisierte Gefäße. Dieses Verhältnis verschob sich, nach 9-monatiger Tumorerkrankung, zugunsten der voll muskularisierten ($18,0 \pm 3,5 \%$; $p < 0,01$ vs. gesunde Kontrollen; $p < 0,05$ vs. Nicht-Tumor-Areal) und partiell muskularisierten Gefäße ($70,0 \pm 2,8 \%$). Nicht muskularisierte Gefäße stellten sich nur noch zu $11,98 \pm 1,54 \%$ dar ($p < 0,001$ vs. gesunde Kontrollen; $p < 0,01$ vs. Nicht-Tumor-Areal).

In der mittleren Gefäßkategorie waren in der gesunden Kontrollgruppe und dem Nicht-Tumor-Areal $9,17 \pm 3,44 \%$, bzw. $0,77 \pm 0,77 \%$ nicht muskularisierte, $56,3 \pm 15,0 \%$ bzw. $65,0 \pm 11,2 \%$ partiell muskularisierte und nur $24,9 \pm 5,7 \%$ bzw. $34,3 \pm 11,0 \%$ voll muskularisierte Gefäße zu finden. Bei den erkrankten transgenen Tieren betrug das Verhältnis voll muskularisierter zu partiell muskularisierter zu nicht muskularisierter Gefäße: $41,7 \pm 11,2 \%$ zu $55,4 \pm 10,3 \%$ zu $2,86 \pm 2,86 \%$. So konnte ein leichter Anstieg des voll muskularisierten Anteils verzeichnet werden (Abb. 3.29 (B)).

Ein ausgeglichenes Bild lieferte die Verteilung des Muskularisierungsgrades in der großen Gefäßkategorie (Abb. 3.29 (C)). Hier verteilten sich der nicht muskularisierte Anteil bei gesunden Kontrolltiere, Nicht-Tumor-Areal und Tumor-Areal auf 0% , $4,17 \pm 4,17 \%$ und 0% , der teil-muskularisierte Part auf $45,4 \pm 15,2 \%$, $66,7 \pm 16,7 \%$, und $61,1 \pm 16,2 \%$ und die voll muskularisierten Gefäße auf $35,2 \pm 13,7 \%$, $29,2 \pm 16,0 \%$ und $38,9 \pm 16,2 \%$.

Die Gefäße der gesunden Kontrolllungen und des Nicht-Tumor-Areals stellten sich in allen Kategorien ähnlich dar und ließen keine signifikanten Unterschiede feststellen.

Gesamtkollagengehalt des rechten Ventrikels

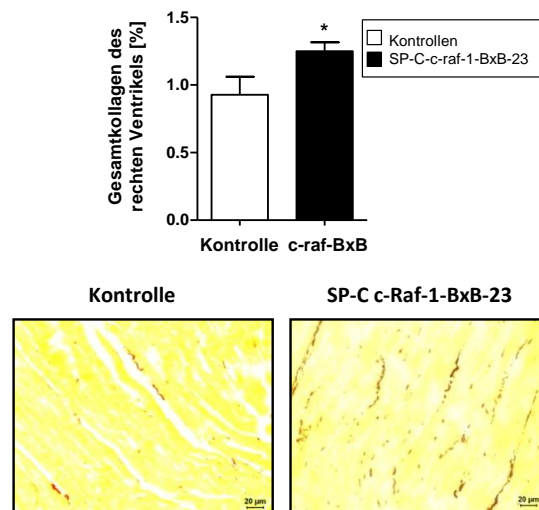


Abbildung 3.30: Färbung und Graphen zur Darstellung des prozentualen Kollagengehalts des rechten Ventrikels im SP-C-c-raf-1-BxB-23-Lungentumormodell (n=9) im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (n=5)

Paraffinschnitte des rechten Ventrikels wurden mit Sirius Red gefärbt, um den Kollagengehalt zu bestimmen. Gezeigt werden repräsentative Aufnahmen des Myokards des rechten Ventrikels aus gesunden Kontrolltieren und aus SP-C-c-raf-1-BxB-23 transgenen Mäusen. (Sirius Red, Originalvergrößerung x400). * $p < 0,05$ – vs. gesunde Kontrollen.

Bei der Bestimmung des Gesamtkollagengehalts der rechten Ventrikel von SP-C-c-raf-1-BxB-23-Mäusen konnte ein signifikanter Anstieg mit durchschnittlichen Werten von $1,25 \pm 0,06$ % im Vergleich zu gesunden Wurfgeschwistern mit im Mittel $0,93 \pm 0,13$ % festgestellt werden ($p < 0,05$). Daher ist mit fortschreitender Tumorerkrankung der Lunge von einer vermehrten Belastung des rechten Ventrikels auszugehen.

3.2 Humane histologische Studie

3.2.1 Histologische Begutachtung

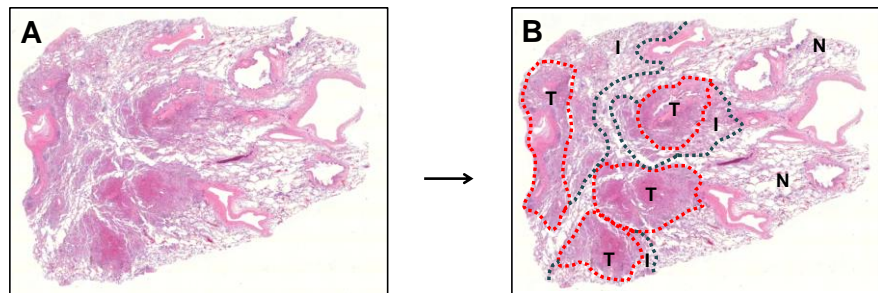


Abbildung 3.31: Histologische Übersichtsaufnahme eines repräsentativen Lungenschnitts eines humanen Plattenepithelkarzinoms (A) mit graphischer Darstellung der Einteilung in Nicht-Tumor-Areal und Tumor-Areal (B)

T: Tumormasse. **I:** verdichtetes Lungengewebe. **T+I:** Tumor-Areal. **N:** Nicht-Tumor-Areal. (Hämatoxylin-Eosin, Mosaikaufnahme).

Zur histologischen Beurteilung standen 7 solide Plattenepithelkarzinome ohne Keratinisierung und 6 überwiegend azinäre Adenokarzinome zur Verfügung. Je nach Schnitt dominierten das Tumor- oder das Nicht-Tumor-Areal. Anders als bei den verwendeten murinen Lungentumormodellen, ermöglichten es die humanen Proben die Bildung von Neointima und, seltener, auch plexiforme Läsionen nachzuweisen, wie ersichtlich aus den Abb. 3.32 und 3.33.

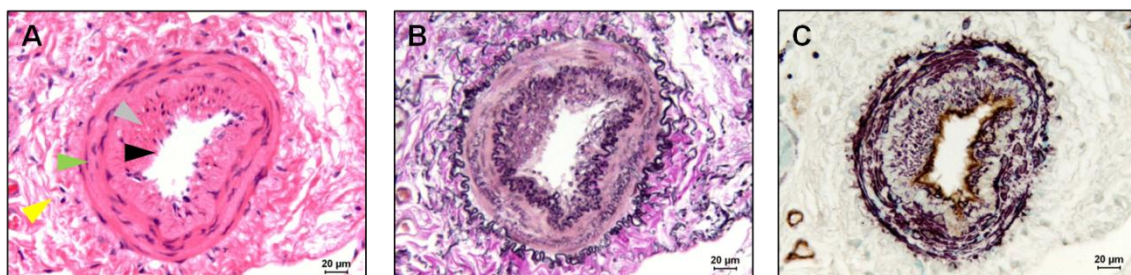


Abbildung 3.32: Serienschnitte eines umgebauten pulmonalen Gefäßes eines humanen Adenokarzinoms mit Neointima

Gefärbt nach Hämatoxylin-Eosin (A), Elastica-van Gieson (B), Anti-α-Aktin/vWF-Doppelfärbung (C). **Pfeilspitzen:** gelb: Adventitia, grün: Media, grau: Neointima, schwarz: Endothel. (Originalvergrößerung x400).

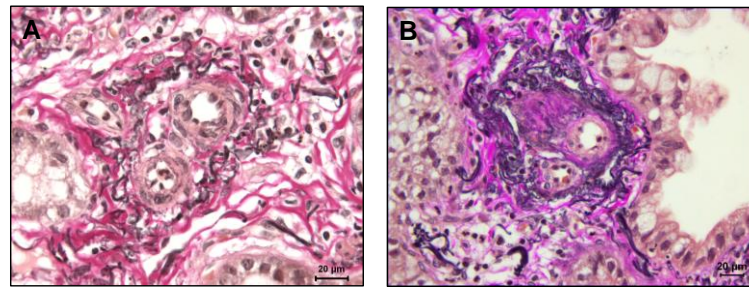


Abbildung 3.33: Plexiforme Läsionen im Tumor-Areal humaner Adenokarzinome (Elastica-van Gieson, Originalvergrößerung x630 (A), x400 (B))

3.2.2 Gefäßmorphometrie

Mediale Wandstärke

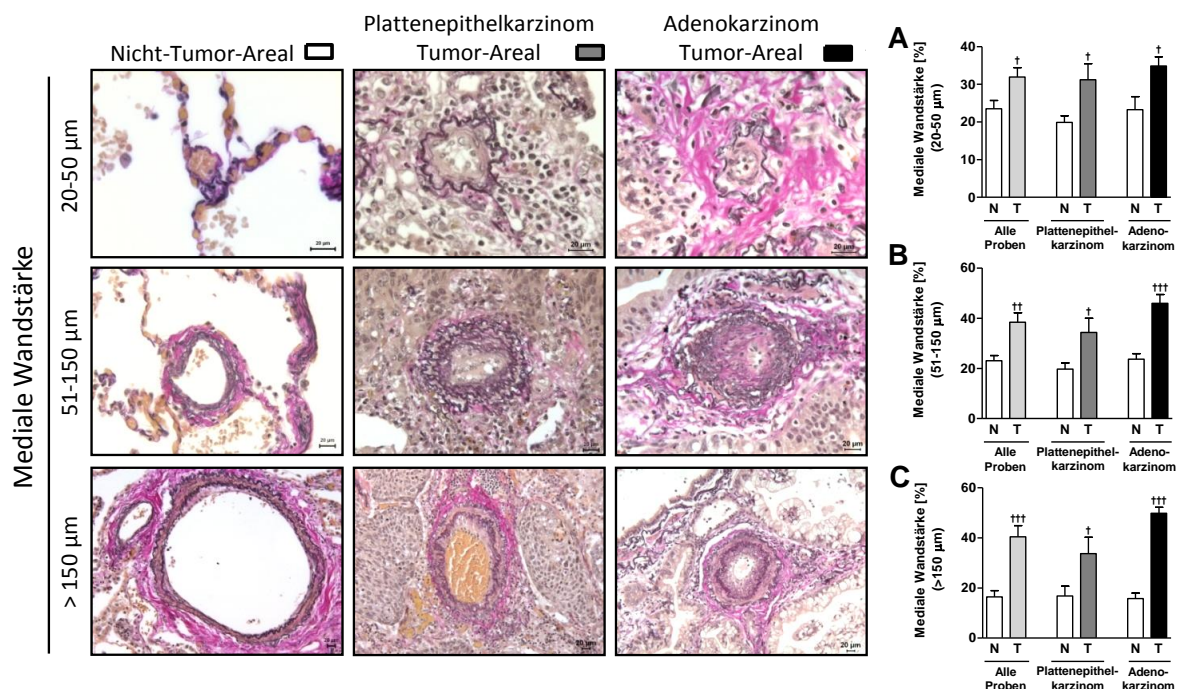


Abbildung 3.34: Färbung und Graphen zur Darstellung der mittleren Wandstärke von Pulmonalgefäßen in Plattenepithel- und Adenokarzinomen, einzeln und zusammengefasst

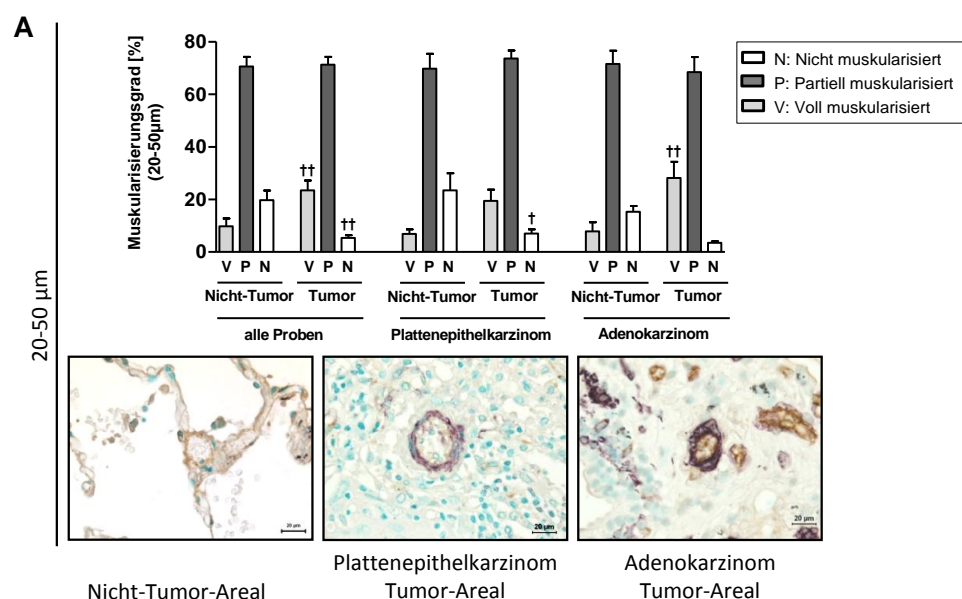
Berücksichtigt wurden Gefäße mit externem Durchmesser von (A) 20-50 µm (n=5-13), (B) 51-150 µm (n=6-13) und (C) >150 µm (n=4-12) [†]p<0,05, ^{††}p<0,01, ^{†††}p<0,001 – vs. Nicht-Tumor-Areal. Paraffin-Lungengewebschnitte wurden nach Elastica-van Gieson gefärbt, um die Wandstärke der Pulmonalgefäße zu bestimmen. Gezeigt werden repräsentative Aufnahmen von Lungengewebschnitten aus dem Nicht-Tumor-Areal (N) und Tumor-Areal (T) der Plattenepithel- und Adenokarzinome. (Elastica-van Gieson, Originalvergrößerung x630 bei 20-50 µm, x400 bei 51-150 µm, x200 bei >150 µm).

Abb. 3.34 (A) verdeutlicht einen signifikanten Anstieg der medialen Wandstärke der kleinen pulmonalen Gefäße im Tumor-Areal im Verhältnis zu denen des unbeteiligten Parts der Tumurlunge, sowohl bei allen humanen Proben zusammengenommen ($31,9 \pm 2,5 \%$ vs. $23,5 \pm 2,2 \%$; $p < 0,05$) als auch aufgeteilt in Plattenepithelkarzinome ($31,2 \pm 4,3 \%$ vs. $19,9 \pm 1,7 \%$; $p < 0,05$) und Adenokarzinome ($34,9 \pm 2,5 \%$ vs. $23,2 \pm 3,5 \%$; $p < 0,05$).

Wie in Abb. 3.34 (B) zu erkennen, konnte ebenfalls eine signifikante Erhöhung für die mittleren Gefäße des Tumor-Areals aller Proben, im Verhältnis zu denen des Nicht-Tumor-Areals ($38,4 \pm 3,8 \%$ vs. $23,0 \pm 2,1 \%$; $p < 0,01$) verzeichnet werden. Ähnliches galt bei der Aufteilung in die verschiedenen histopathologischen Typen für solide Plattenepithelkarzinome ($34,3 \pm 5,7 \%$ vs. $19,7 \pm 2,5 \%$; $p < 0,05$) und überwiegend azinäre Adenokarzinome ($45,9 \pm 3,5 \%$ vs. $23,7 \pm 2,2 \%$; $p < 0,001$).

Wie bei den kleinen und mittleren pulmonalen Gefäßen läßt die große Gefäß-kategorie bei den Gefäßen des Tumor-Areals aller Proben eine durchschnittliche Erhöhung der medialen Wandstärke erkennen mit Werten von $40,4 \pm 4,5 \%$, im Verhältnis zu denen des Nicht-Tumor-Areals ($16,4 \pm 2,5 \%$; $p < 0,001$), ebenso wie aufgeteilt in Plattenepithelkarzinome ($33,7 \pm 6,5 \%$ vs. $16,8 \pm 3,9 \%$; $p < 0,05$) und Adenokarzinome ($49,8 \pm 2,4 \%$ vs. $15,8 \pm 2,2 \%$; $p < 0,001$) (Abb. 3.34 (C)).

Muskularisierungsgrad



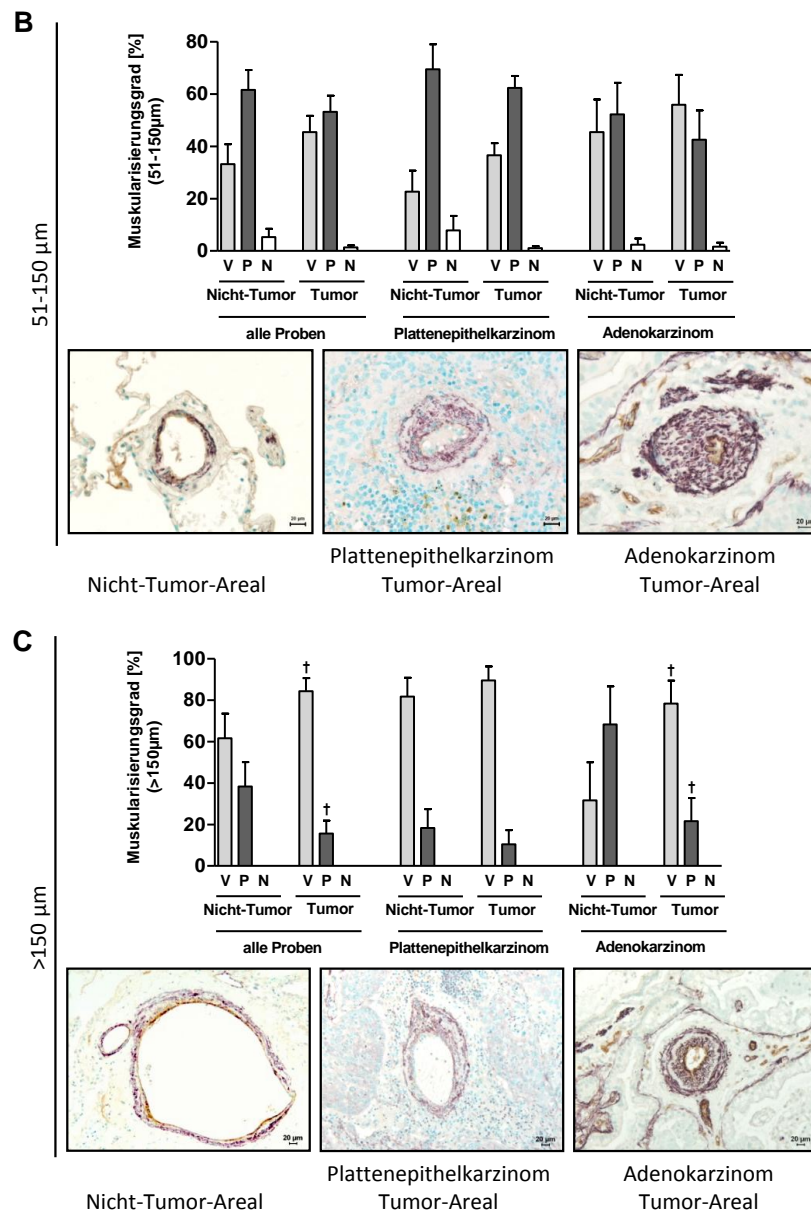


Abbildung 3.35: Färbung und Graphen zur Darstellung des Muskularisierungsgrads von Pulmonalgefäßen in Plattenepithel- und Adenokarzinomen, einzeln und zusammengefasst

Berücksichtigt wurden Gefäße mit einem externen Durchmesser von (A) 20-50 µm (n=5-13), (B) 51-150 µm (n=6-13) und (C) >150 µm (n=4-13). [†]p<0,05, ^{††}p<0,01 – vs. Nicht-Tumor-Areal.

Paraffin-Lungengewebschnitte wurden anhand einer immunhistochemischen Doppelfärbung gegen den endothelialen von Willebrand-Faktor und das glattmuskuläre α-Aktin gefärbt, um den Muskularisierungsgrad der Pulmonalgefäße zu bestimmen. Gezeigt werden repräsentative Aufnahmen von Lungengewebschnitten aus dem Nicht-Tumor-Areal und Tumor-Areal der Plattenepithel- und Adenokarzinome. (Anti-α-Aktin/vWF-Doppelfärbung, Originalvergrößerung x630 bei 20-50 µm, x400 bei 51-150 µm, x200 bei >150 µm).

Im Nicht-Tumor-Areal aller Lungengewebschnitte zusammengekommen bildeten die nicht muskularisierten Gefäße der Kategorie von 20-50 µm im Mittel Anteile von $19,7 \pm 3,7 \%$, wobei im Tumor-Areal der Anteil nicht muskularisierter Arterien im Verlauf der Erkrankung signifikant abfiel. So betrug der Anteil nicht muskularisierter Gefäße dort $5,35 \pm 1,00 \%$ ($p < 0,01$). Der Anteil voll muskularisierter und partiell muskularisierter Gefäße nahm dagegen teils signifikant zu. Es wurden $23,5 \pm 3,7 \%$ voll muskularisierte und $71,2 \pm 3,1 \%$ partiell muskularisierte Gefäße im Tumor-Areal erfasst, im Gegensatz zum Nicht-Tumor-Areal, das Werte von $9,77 \pm 2,96 \%$ ($p < 0,01$) voll bzw. $70,6 \pm 3,7 \%$ partiell muskularisierter Gefäße aufwies. Ähnlich verhielten sich Plattenepithel- und Adenokarzinome einzeln. So spiegeln im Tumor-Areal der Plattenepithelkarzinome voll, partiell und nicht muskularisierte Gefäße Anteile von $19,4 \pm 4,3 \%$, $73,6 \pm 3,1 \%$, bzw. $6,98 \pm 1,58 \%$ wieder, im Gegensatz zum Nicht-Tumor-Areal mit $6,86 \pm 1,76 \%$ voll, $69,7 \pm 5,7 \%$ partiell und $23,4 \pm 6,5 \%$ nicht muskularisierten Gefäßen. Eine signifikante Abnahme des Anteils nicht muskularisierter Gefäße konnte dabei registriert werden ($p < 0,05$). Wie weiter aus Abb. 3.35 (A) zu ersehen, verzeichneten die kleinen Gefäße, beim Betrachten des Tumor-Areals der Adenokarzinome, einen signifikanten Anstieg voll muskularisierter Gefäße ($28,1 \pm 6,2 \%$ vs. $7,80 \pm 3,46 \%$; $p < 0,01$) und eine Abnahme nicht muskularisierter Gefäße ($3,44 \pm 0,59 \%$ vs. $15,3 \pm 2,2 \%$) im Vergleich zum Nicht-Tumor-Areal. Nur gering fiel der Anteil partiell muskularisierter Gefäße im Tumor-Areal der Adenokarzinome auf Werte von $68,4 \pm 5,7 \%$, im Verhältnis zum Nicht-Tumor-Areal ($71,6 \pm 5,0 \%$).

In der mittleren Gefäßkategorie waren die Anteile nicht muskularisierter Gefäße stets gering. So zeigten in der Begutachtung aller Proben das Nicht-Tumor-Areal sowie das Tumor-Areal Anteile von $5,31 \pm 3,17 \%$ bzw. $1,3 \pm 0,8 \%$, das Nicht-Tumor-Areal und das Tumor-Areal der Plattenepithelkarzinome $7,82 \pm 5,57 \%$ bzw. $1,12 \pm 0,76 \%$ und das Adenokarzinom im Mittel im Nicht-Tumor-Areal und Tumor-Areal $2,38 \pm 2,38 \%$ bzw. $1,59 \pm 1,59 \%$. Sowohl in der Zusammenfassung aller Proben, als auch den beiden Karzinomatypen einzeln, konnte eine Tendenz zu weniger partiell muskularisierten und zu mehr voll muskularisierten Gefäßen im

Tumor-Areal ausgemacht werden. So ließen alle Proben zusammengelegt im Nicht-Tumor-Areal Anteile von $33,2 \pm 7,6 \%$ voll, bzw. $61,5 \pm 7,6 \%$ partiell muskularisierte Gefäße erkennen. Im Gegensatz dazu wies das Tumor-Gebiet $45,5 \pm 6,2 \%$ voll und $53,2 \pm 6,1 \%$ partiell muskularisierte Gefäße auf. In den Plattenepithelkarzinomen einzeln sind $22,7 \pm 8,0 \%$ voll und $69,5 \pm 9,5 \%$ partiell muskularisierte Gefäße im Nicht-Tumor-Areal zu finden, im Vergleich zu $36,5 \pm 4,7 \%$ voll und $62,4 \pm 4,5 \%$ partiell muskularisierten Gefäßen im Tumor-Areal. Bei den Adenokarzinome aufweisenden Lungen betrug das Verhältnis der voll muskularisierten zu partiell muskularisierten Gefäßen im Tumor-Gebiet $55,9 \pm 11,4 \%$ zu $42,5 \pm 11,2 \%$, wobei sich diese Anteile im Nicht-Tumor-Areal folgendermaßen verteilten: $45,4 \pm 12,5 \%$ voll, $52,2 \pm 12,0 \%$ partiell (Abb. 3.35 (B)).

Wie aus Abb. 3.35 (C) ersichtlich, wurden in der Gefäßkategorie von über $150\mu\text{m}$ lediglich muskularisierte Gefäße aufgefunden. Zudem steigerte sich der Anteil voll muskularisierter Gefäße im Tumor-Gebiet aller untersuchten Lungenkrebschnitte signifikant. So betrug dieser Wert, bei allen Proben zusammengefasst, im Nicht-Tumor-Areal $61,7 \pm 11,8 \%$ und im Tumor-Areal $84,4 \pm 6,2 \%$ ($p < 0,05$). Im Nicht-Tumor-Areal der Plattenepithelkarzinome belief sich dieser Wert auf $81,7 \pm 9,1 \%$ und im Tumor-Areal auf $89,5 \pm 6,8 \%$. Bei Adenokarzinomen betrug er im Nicht-Tumor-Areal $31,7 \pm 18,3 \%$ und im Tumor-Areal $78,3 \pm 11,1 \%$ und stieg somit signifikant an ($p < 0,05$). Partuell muskularisierte Gefäße zeigten signifikant verringerte Anteile mit Werten von $38,3 \pm 11,8 \%$, bzw. $15,6 \pm 6,2 \%$ im Nicht-Tumor- und Tumor-Areal aller Proben ($p < 0,05$) und $68,3 \pm 18,3 \%$, bzw. $21,7 \pm 11,1 \%$ im Nicht-Tumor- und Tumor-Areal der Adenokarzinome ($p < 0,05$). Weniger deutlich stellt sich die Abnahme partiell muskularisierter Gefäße im Nicht-Tumor- und Tumor-Areal der Plattenepithelkarzinome dar ($18,3 \pm 9,1 \%$, vs. $10,48 \pm 6,80 \%$). Lediglich im Nicht-Tumor-Bereich der Adenokarzinome überstieg der Anteil partiell muskularisierter Gefäße den der voll muskularisierten.

3.2.3 Quantifizierung von Immunzellen in den pulmonalen Gefäßwänden

3.2.3.1 Quantitative Bestimmung CD3-positiver T-Lymphozyten

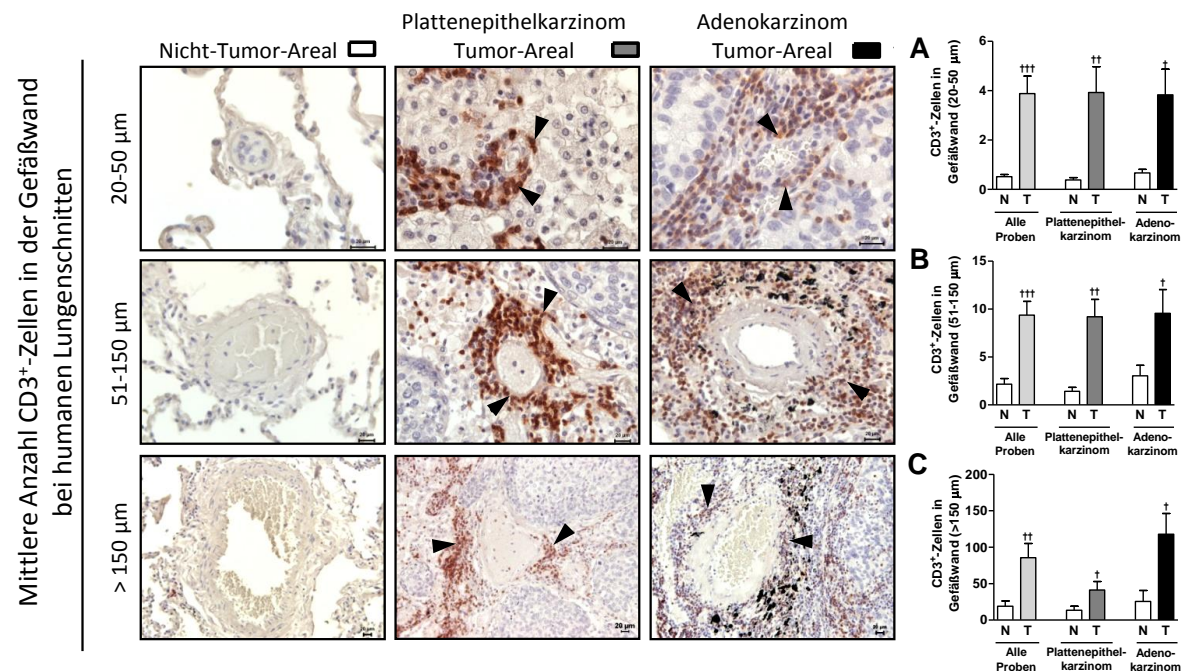


Abbildung 3.36: Färbung und Graphen zur Darstellung des T-Lymphozyten-Gehalts in den Wänden der pulmonalen Gefäße in humanen Plattenepithel- und Adenokarzinomen, einzeln und zusammengefasst

Berücksichtigt wurden Gefäße eines externen Durchmessers von (A) 20-50 µm (n=6-13), (B) 51-150 µm (n=6-13) und (C) >150 µm (n=5-13). [†]p<0,05, ^{††}p<0,01, ^{†††}p<0,001 – vs. Nicht-Tumor-Areal.

Paraffin-Lungengewebschnitte wurden anhand einer immunhistochemischen Färbung gegen das CD3-Antigen zur quantitativen Bestimmung von T-Lymphozyten gefärbt. Gezeigt werden repräsentative Aufnahmen von Lungengewebschnitten aus dem Nicht-Tumor-Areal (N) und Tumor-Areal (T) der Plattenepithel- und Adenokarzinome. Pfeilspitzen markieren positiv gefärbte Zellen in der Gefäßwand. (Anti-CD3-Färbung, Originalvergrößerung x630 bei 20-50 µm, x400 bei 51-150 µm, x200 bei >150 µm).

Wie die Abb. 3.36 (A) verdeutlicht, offenbarte das Auszählen der CD3⁺-Zellen in Intima, Media und Adventitia der kleinen pulmonalen Gefäße einen signifikanten Anstieg des Lymphozytengehalts pro Gefäß im Tumor-Areal im Vergleich zum

Nicht-Tumor-Areal. So befanden sich in den Gefäßwänden des Tumor-Areals aller Proben zusammengekommen im Mittel $3,88 \pm 0,71$ T-Lymphozyten, im Nicht-Tumor-Areal hingegen $0,51 \pm 0,09$ ($p < 0,001$). $3,92 \pm 1,05$ konnten durchschnittlich in den kleinen Gefäßen des Tumor-Areals der Plattenepithelkarzinome gezählt werden, $3,83 \pm 1,04$ im Tumor-Gebiet der Adenokarzinome. Im Vergleich dazu konnten $0,38 \pm 0,10$ ($p < 0,01$) T-Lymphozyten im Nicht-Tumor-Gebiet der Plattenepithelkarzinome resp. $0,67 \pm 0,15$ ($p < 0,05$) im Nicht-Tumor-Areal der Adenokarzinome ermittelt werden.

In den Gefäßwänden aller mittleren Arterien dominierten erneut signifikant T-Lymphozyten im Tumor-Gebiet ($9,36 \pm 1,43$), verglichen mit ihrer Anzahl im Nicht-Tumor-Gebiet ($2,16 \pm 0,58$; $p < 0,001$). Im Tumor-Areal der Plattenepithelkarzinome konnten $9,19 \pm 1,80$ CD3⁺-Zellen pro Gefäß nachgewiesen werden, wobei sich die T-Lymphozyten des Nicht-Tumor-Areals auf $1,41 \pm 0,41$ beschränkten ($p < 0,01$). Zudem zeigten sich für die Adenokarzinome im Tumor-Areal signifikant erhöhte Mengen an T-Lymphozyten pro Gefäß von $9,55 \pm 2,48$ im Verhältnis zu $3,04 \pm 1,10$ im Nicht-Tumor-Areal ($p < 0,05$) (Abb. 3.36 (B)).

Eine ähnliche Verteilung an CD3⁺-Zellen konnte, wie in Abb. 3.36 (C) zu erkennen, für die großen Pulmonalgefäße aufgezeigt werden. Während in allen Proben zusammengefasst $18,9 \pm 7,3$, in Plattenepithelkarzinomen $13,37 \pm 5,60$ und Adenokarzinomen $25,6 \pm 15,0$ im Nicht-Tumor-Areal dokumentiert wurden, waren T-Lymphozyten im Tumor-Areal mit Werten von $85,6 \pm 19,7$ ($p < 0,01$), $41,3 \pm 11,6$ ($p < 0,05$) und $117,7 \pm 28,5$ ($p < 0,05$) signifikant zahlreicher vorhanden.

Auf diese Weise konnten bei humanen Schnitten in allen Größenkategorien der pulmonalen Gefäße signifikant erhöhte Mengen an T-Lymphozyten in den Gefäßwänden des Tumor-Areals bewiesen werden. Nach Durchführung der äquivalenten Färbung bei murinen Lungengewebschnitten der LLC1- und K-ras^{LA2}-Lungentumormodells, konnte eine ähnliche Verteilung der CD3⁺-Zellen aufgezeigt werden, mit dem einzigen Unterschied, dass die T-Lymphozyten in deutlich geringerer Häufigkeit vorlagen. So ist aus den repräsentativen Aufnahmen der Abb. 3.37 eine bevorzugte Lokalisation der T-Lymphozyten in murinen Schnitten zugunsten der Gefäßwände im Tumor-Areal zu entnehmen.

T-Lymphozyten konnten sowohl in humanen wie auch murinen Schnitten innerhalb des dichten Tumorparenchyms, aber vor allem in der Tumorperipherie, in großen Anhäufungen nachgewiesen werden. In den Gefäßwänden waren sie fast ausschließlich in der äußersten Gefäßschicht, der Adventitia, zu lokalisieren.

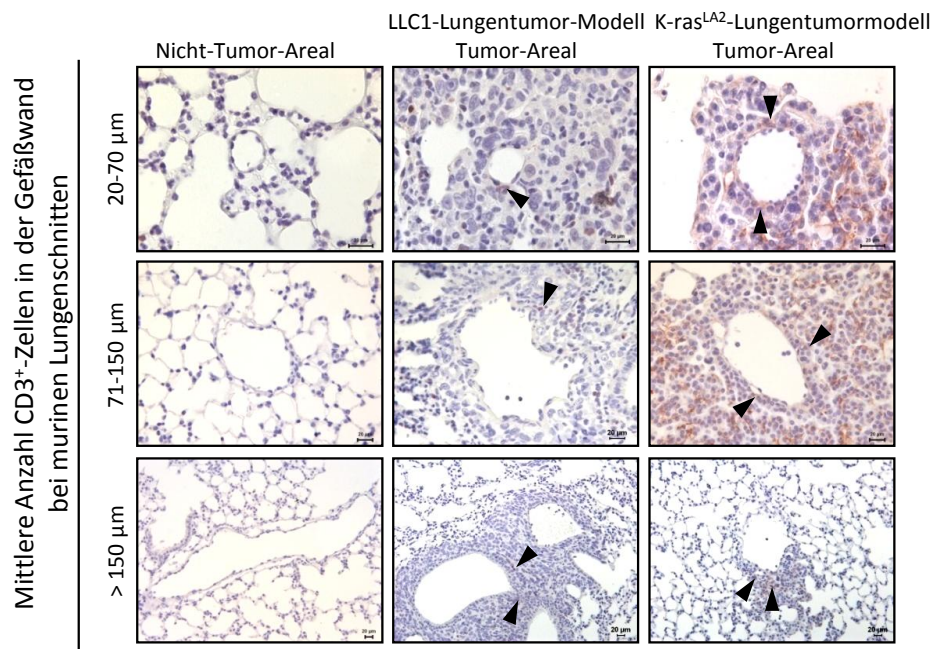


Abbildung 3.37: Färbung zur Darstellung des T-Lymphozyten-Gehalts in den Wänden der pulmonalen Gefäße eines externen Durchmessers von 20-70 µm, 71-150 µm und >150 µm im LLC1- und K-ras^{LA2}-Lungentumormodell

Paraffin-Lungengewebschnitte wurden anhand einer immunhistochemischen Färbung gegen das CD3-Antigen gefärbt. Gezeigt werden repräsentative Aufnahmen von Lungengewebschnitten aus dem Nicht-Tumor-Areal und Tumor-Areal des LLC1- und K-ras^{LA2}-Lungentumormodells. Pfeilspitzen markieren positiv gefärbte Zellen in der Gefäßwand. (Anti-CD3-Färbung, Originalvergrößerung x630 bei 20-70 µm, x400 bei 71-150 µm, x200 bei >150 µm).

3.2.3.2 Quantitative Bestimmung CD68-positiver Makrophagen

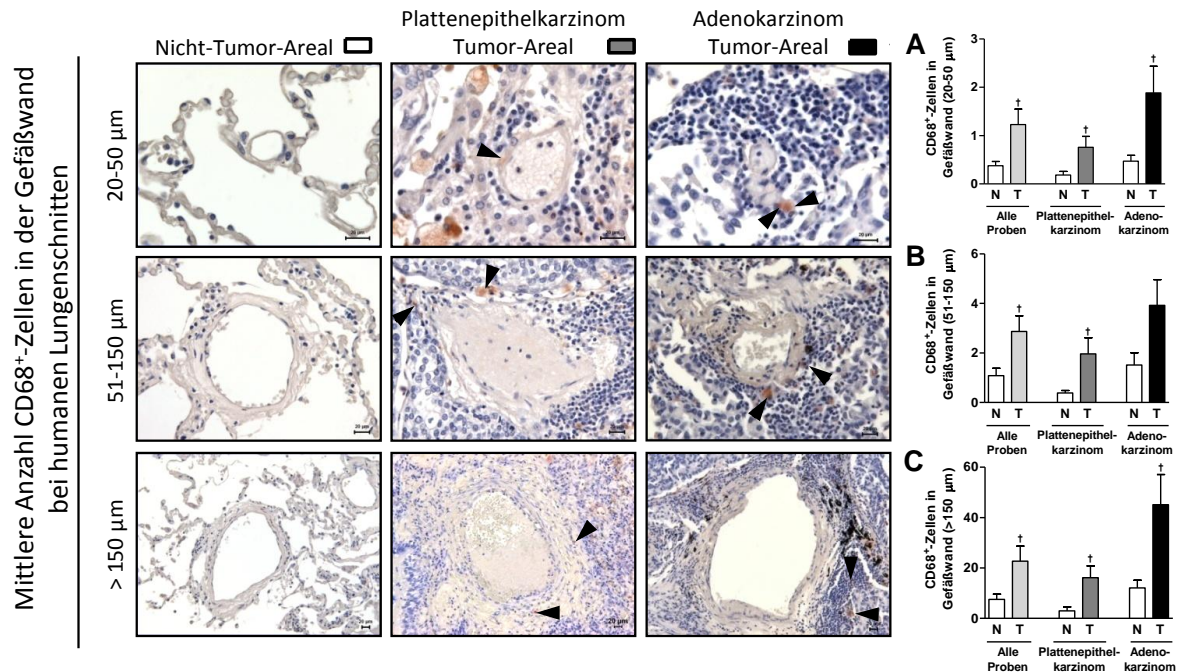


Abbildung 3.38: Färbung und Graphen zur Darstellung des Makrophagen-Gehalts in den Wänden der pulmonalen Gefäße in humanen Plattenepithel- und Adenokarzinomen, einzeln und zusammengefasst

Berücksichtigt wurden Gefäße eines externen Durchmessers von (A) 20-50 µm (n=6-13), (B) 51-150 µm (n=6-13) und (C) >150 µm (n=4-13). [†]p<0,05 – vs. Nicht-Tumor-Areal.

Paraffin-Lungengewebsschnitte wurden anhand einer immunhistochemischen Färbung gegen das CD68-Glykoprotein zur quantitativen Bestimmung von Makrophagen gefärbt. Gezeigt werden repräsentative Aufnahmen von Lungengewebsschnitten aus dem Nicht-Tumor-Areal (N) und Tumor-Areal (T) der Plattenepithel- und Adenokarzinome. Pfeilspitzen markieren positiv gefärbte Zellen in der Gefäßwand. (Anti-CD68-Färbung, Originalvergrößerung x630 bei 20-50 µm, x400 bei 51-150 µm, x200 bei >150 µm).

Die Ermittlung des Makrophagengehalts pro Gefäß in den Wänden kleiner pulmonaler Gefäße ergab in Abb. 3.38 (A) eine signifikante Zunahme im Tumor-Areal aller Proben ($1,23 \pm 0,32$; $p<0,05$), der Plattenepithelkarzinome ($0,76 \pm 0,23$; $p<0,05$) und der Adenokarzinome ($1,88 \pm 0,55$; $p<0,05$) im Vergleich zu den Gefäßen des jeweiligen Nicht-Tumor-Areals ($0,38 \pm 0,09$, $0,18 \pm 0,08$, bzw. $0,47 \pm 0,12$).

In den mittleren Gefäßen erhöhte sich dieser Wert ebenfalls im Tumor-Areal der Lungengewebschnitte von Plattenepithel- und Adenokarzinom-Patienten. So stieg der Gehalt an CD68⁺-Zellen pro Gefäß bei den Plattenepithelkarzinomen signifikant von $0,38 \pm 0,10$ im Nicht-Tumor-Areal auf $1,96 \pm 0,65$ ($p < 0,05$) im Tumor-Gebiet und bei den Adenokarzinomen von $1,51 \pm 0,49$ im Nicht-Tumor- auf $3,92 \pm 1,04$ im Tumor-Areal. Alle Schnitte zusammengenommen ergaben Unterschiede im Gefäßgehalt an Makrophagen von $1,08 \pm 0,30$ im Nicht-Tumor- und $2,87 \pm 0,63$ im Tumor-Areal ($p < 0,05$) (Abb. 3.38 (B)).

Abb. 3.38 (C) zeigt ebenso signifikante Erhöhungen der sich in den großen Gefäßwänden befindlichen Makrophagen im Tumor-Areal im Vergleich zum Nicht-Tumor-Areal. So wächst deren Präsenz pro Gefäß in der resümierten Gruppe von $7,52 \pm 2,03$ im Nicht-Tumor-Areal auf $22,7 \pm 6,0$ im Tumor-Areal ($p < 0,05$), in der Plattenepithelkarzinomgruppe von $2,96 \pm 1,53$ im Nicht-Tumor-Areal auf $16,1 \pm 4,7$ im Tumor-Areal ($p < 0,05$) und in der Adenokarzinom-Gruppe von $12,05 \pm 3,09$ im Nicht-Tumor-Areal auf $45,1 \pm 12$ im Tumor-Areal ($p < 0,05$). Wie die T-Lymphozyten wiesen somit auch Makrophagen als bevorzugte Lokalisation die Gefäße des Tumor-Areals der verwendeten humanen Lungenkrebsschnitte auf.

Weniger häufig nachzuweisen wie T-Lymphozyten waren die Makrophagen. Sie wurden sowohl innerhalb wie auch am Rande der dichten Tumormasse lokalisiert. Bei der Lokalisation der Makrophagen in der Gefäßwand kann ein deutlicher Tropismus zur Adventitia erkannt werden.

3.2.3.3 Quantitative Bestimmung CD209-positiver dendritischer Zellen

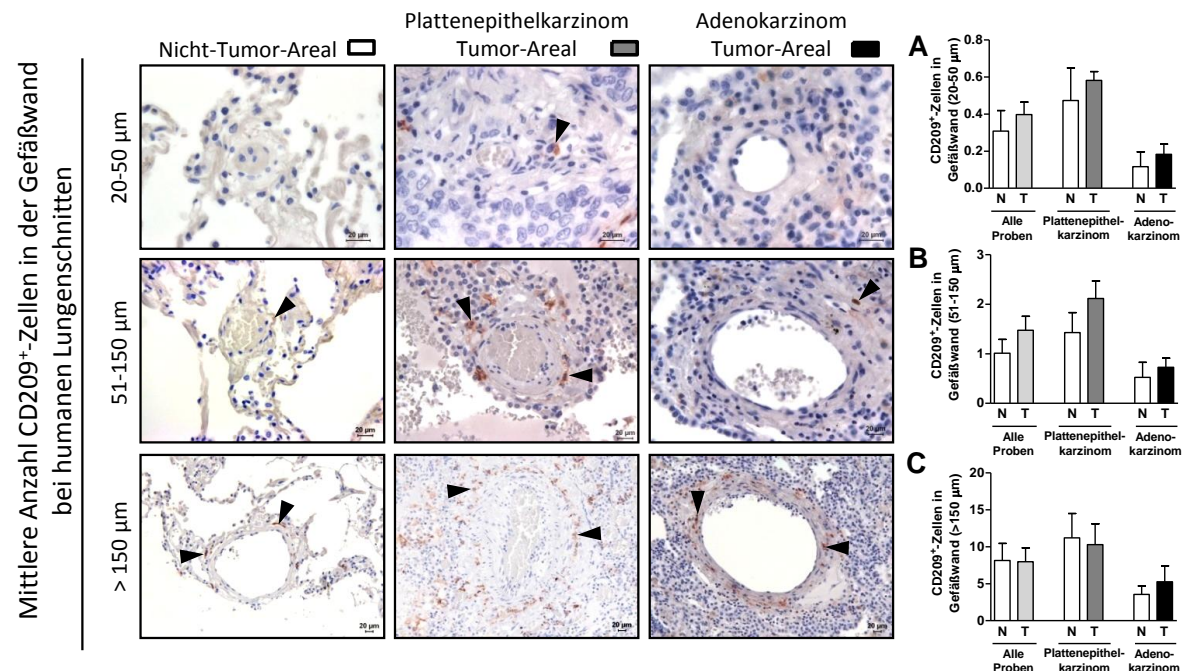


Abbildung 3.39: Färbung und Graphen zur Darstellung des Gehalts an dendritischen Zellen in den Wänden der pulmonalen Gefäße in humanen Plattenepithel- und Adenokarzinomen, einzeln und zusammengefasst

Berücksichtigt wurden Gefäße eines externen Durchmessers von (A) 20-50 µm (n=6-13), (B) 51-150 µm (n=6-13) und (C) >150 µm (n=4-13).

Paraffin-Lungengewebsschnitte wurden anhand einer immunhistochemischen Färbung gegen das CD209-Membranproteins zur quantitativen Bestimmung von dendritischen Zellen gefärbt. Gezeigt werden repräsentative Aufnahmen von Lungengewebsschnitten aus dem Nicht-Tumor-Areal (N) und Tumor-Areal (T) der Plattenepithel- und Adenokarzinome. Pfeilspitzen markieren positiv gefärbte Zellen in der Gefäßwand. (Anti-CD209-Färbung, Originalvergrößerung x630 bei 20-50 µm, x400 bei 51-150 µm, x200 bei >150 µm).

Im Gegensatz zu T-Lymphozyten und Makrophagen, ergab die quantitative Beurteilung der Verteilung dendritischer Zellen ein sehr heterogenes Bild. Abb. 3.39 (A) läßt erkennen, dass diese Zellen sowohl im Nicht-Tumor-Areal als auch im Tumor-Gebiet in geringen und sich ähnelnden Mengen vorlagen. In den kleinen Gefäßen der Plattenepithelkarzinome wurde ein pro-Gefäß-Gehalt von $0,58 \pm 0,05$ im Tumor-Areal und $0,47 \pm 0,18$ im Nicht-Tumor-Areal und in den

Adenokarzinomen eine Verteilung von $0,18 \pm 0,05$ im Tumor-Areal und $0,12 \pm 0,08$ im Nicht-Tumor-Areal aufgedeckt. Wurden alle Schnitte zusammengefasst, ergaben sich Werte pro Gefäß von $0,40 \pm 0,07$ im Tumor-Gebiet und $0,31 \pm 0,11$ im Nicht-Tumor-Gebiet.

Wie in Abb. 3.39 (B) zu ersehen, konnte bei der Verteilung der dendritischen Zellen in den Gefäßwänden mittlerer Gefäße ein leichter Anstieg in den Tumor-Gefäßen verzeichnet werden. So konnten Mengen von $1,01 \pm 0,28$, $1,43 \pm 0,40$, $0,52 \pm 0,31$ im Nicht-Tumor-Areal aller Proben, der Plattenepithelkarzinome und Adenokarzinome verzeichnet werden, wobei sich im Tumor-Areal der gleichen Schnitte $1,48 \pm 0,28$, $2,12 \pm 0,35$, bzw. $0,73 \pm 0,18$ Makrophagen befanden.

Ein ausgeglichenes Bild zeigten wiederum die pulmonalen Gefäße eines externen Durchmessers über $150\mu\text{m}$ (Abb. 3.39 (C)). In der zusammengefassten Gruppe verteilten sich die CD209⁺-Zellen mit Werten pro Gefäß von $8,15 \pm 2,31$ und $7,97 \pm 1,89$ gleichmäßig im Nicht-Tumor- und im Tumor-Areal. Ein ähnliches Resultat konnte für die Plattenepithelkarzinomschnitte im Nicht-Tumor-Areal und Tumor-Gebiet ($11,21 \pm 3,29$ vs. $10,29 \pm 2,82$) und in den Adenokarzinomschnitten ($3,56 \pm 1,15$ vs. $5,27 \pm 2,15$) erbracht werden. Es bestanden in den untersuchten humanen Lungenkrebsschnitten somit keine Unterschiede in der vaskulären Verteilung dendritischer Zellen zwischen Tumor-Gebiet und Nicht-Tumor-Gebiet.

Dendritische Zellen konnten nur vereinzelt nachgewiesen werden, wobei keine Präferenz zu einer bestimmten Lokalisation inmitten, am Rand oder außerhalb des Tumors zu verzeichnen war. Ebenso wie die bereits beschriebenen Entzündungszellen, befanden sich dendritische Zellen bevorzugt in der Adventitia der untersuchten Gefäße.

4 Diskussion

4.1 Wahl der Tiermodelle

Sich sekundär nach einer unabhängigen Erkrankung entwickelnde pulmonale Hypertonien repräsentieren die Mehrheit aller pulmonalen Überdruck-erkrankungen. So haben beispielsweise Patienten, die an einer Mitralklappenstenose leiden (WHO Gruppe 2.2), initial nur passiv erhöhte Werte des pulmonalarteriellen Drucks. Progressiv entwickelt sich jedoch eine irreversible pulmonale Arteriopathie, die stark derer pulmonalarterieller Überdruckpatienten ähnelt (WHO Gruppe 1) (Jain *et al.*, 2007). Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, Lungenkrebs als einen weiteren möglichen Risikofaktor für die sekundäre Entstehung der pulmonalen Hypertonie zu determinieren und systematisch zu untersuchen.

Krebs und pulmonale Hypertonie besitzen in der Tat in ihrer Pathogenese viele Gemeinsamkeiten. So hat beispielsweise Otto Warburg bei Krebszellen einen Phänotypen beschrieben, der, trotz reichlichen Sauerstoffvorkommens, einen metabolischen Wechsel von oxidativer Phosphorylierung hin zu Glykolyse vollzieht (Warburg, 1926). Forschungsergebnisse belegen, dass pulmonalarterielle Hypertonie und Krebs sich diesen „Warburg Phänotypen“ teilen (Bonnet *et al.*, 2006; Bonnet *et al.*, 2007a). Weitere molekularbiologische Gemeinsamkeiten in den zellulären Vorgängen können zudem zwischen der Tumorigenese und der Entwicklung von pulmonaler Hypertonie identifiziert werden. Dazu gehören eine erhöhte Tendenz der implizierten Zellen zu Proliferation, Apoptose-Resistenz, Migration und Invasion (Schermlay und Grimminger, 2008). Außerdem heben Therapeutika, wie z.B. der PDGF-Rezeptor-Inhibitor Imatinib, welcher zur Behandlung von chronisch myeloischer Leukämie zugelassen ist, in Tiermodellen der pulmonalen Hypertonie die auftretenden vaskulären Gefäßumbauprozesse vollständig auf (Schermlay und Grimminger, 2008).

Die nachzuweisende pulmonale Hypertonie stellt eine Erkrankung mit mannigfaltigen Ursachen dar, die letztendlich durch ein komplexes Zusammenspiel zahlreicher Zelltypen bedingt ist. Diese Prozesse umfassen u.a. Interaktionen zwischen Gefäßendothel, -muscularis und -adventitia, sowie

Wechselwirkungen zwischen Herz und Lunge. Um diese komplexe *in vivo*-Situation zu analysieren, müssen Untersuchungen an Tiermodellen vorgenommen werden, bei denen invasive Techniken bis hin zur Tiertötung und Untersuchungen der Lunge notwendig sind.

4.1.1 Lewis Lung Carcinoma 1-Lungentumormodell

In dieser Arbeit wurde zunächst das Lewis Lung Carcinoma 1-Modell gewählt, bei dem eine intravenöse Verabreichung von LLC1-Zellen in die laterale Schwanzvene durchgeführt wurde. Dieses allotransplantierte Modell ermöglicht es den mehrstufigen Prozess der Metastasierung zu imitieren: das Überleben von Tumorzellen im Blut, die Extravasation in entfernten Körperregionen, die Anpassung an neues Gewebe und das Wachstum von Geschwülsten. Vorangehende Schritte des Metastasierungsprozesses, wie das invasive Wachstum der Tumorzellen und die Intravasation, können dabei jedoch nicht simuliert werden.

Dieses Verfahren führt zu einem akuten Krankheitsbild, welches während eines nur 18-tägigen Krankheitsverlaufs schnell voranschreitet und die Untersuchung fortgeschrittener, laut TNM-Klassifikation, später Tumorstadien ermöglicht. Der Untersuchungszeitraum wurde bewusst auf 18 Tage festgelegt, da zum einen identische Versuchsbedingungen zur Anwendung des LLC1-Modells in der Literatur beschrieben sind (Chang *et al.*, 2006) und zum anderen sich pulmonale Hypertonie in Mäusen bei dauerhafter Hypoxie-Exposition bei 10 % O₂ innerhalb von 3 Wochen entwickelt (Dahal *et al.*, 2010). Die nach 18 Tagen zu 100 % aufgetretenen multiplen nodulären, z.T. konfluenten Adenokarzinome führten zu Gewichtsstagnation, reduziertem Allgemeinbefinden und erhöhter Atemfrequenz.

Neben direkten, lokalen Interaktionen zwischen den sich entwickelnden Krebsgeschwülsten und dem umliegenden intakten Lungengewebe, können bei diesem Modell verstärkt intravaskuläre Scherkräfte auf das pulmonale Gefäßbett einwirken und schließlich erhöhte pulmonalarterielle Drücke, sowie vaskuläres Remodeling hervorrufen. Das einmalige Einbringen großer Mengen an LLC1-Zellen, zunächst in den großen, dann in den kleinen pulmonalen Kreislauf könnte

zu Clusterbildung und einer mechanischen Beeinträchtigung der Gefäßfunktion führen. Das immer dichter und enger werdende pulmonale Gefäßnetz, welches in den Lungenkapillaren lediglich einen Durchmesser von 4-9 µm zeigt, weist geringere Weiten auf, als theoretisch für die Passage der LLC1-Zellen eines mittleren, eigens gemessenen Durchmessers von etwa 16 µm benötigt wird (Savai *et al.*, 2005). Dem steht jedoch die Tatsache gegenüber, dass zelluläre Bestandteile des Blutes, wie beispielsweise Monozyten, mit einem ähnlichen Durchmesser von 20 µm, durch amöboide Verformung ebenso befähigt sind, ohne mechanische Behinderung, Kapillaren zu durchqueren (Emminger, 2005). Ob dies ebenfalls für die LLC1-Zellen zutrifft, oder ob ihre, als gering beschriebene Motilität (Bertram und Janik, 1980), zu erhöhten Scherkräften in den pulmonalen Gefäßen führt, ist unklar. Ansteigende Scherkräfte sind nämlich in der Lage pulmonale Hypertonie auszulösen, indem sie die Endothelzellen dazu veranlassen Kollagenablagerungen zu fördern und die Proliferation glatter Muskelzellen innerhalb der Gefäßwände zu stimulieren. Dies läßt wiederum den pulmonalen vaskulären Widerstand ansteigen (Kasper, 2005). Das Eindringen von Tumorzellen in die Blutgefäßbahnen, während der Metastasierung, stellt ein immerzu unter natürlichen Bedingungen auftretendes Ereignis im Rahmen der Kanzerogenese dar. Somit ermöglicht das LLC1-Modell den Beitrag intravasaler Zellen zum Krankheitsverlauf der pulmonalen Hypertonie zu untersuchen, ähnlich der in der Literatur beschriebenen Beeinflussung des pulmonalen Gefäßbetts durch große, proximale Tumorzellembolien oder Tumorzellmikroembolien (Kane *et al.*, 1975; Fanta und Compton, 1980).

Ob daneben auch lokale Interaktionen zwischen den Tumoren mit dem umliegenden Lungengewebe stattfinden, sollte im weiteren Verlauf der Arbeit anhand eines zweiten Lungenkrebsmodells, des K-ras^{LA2}-Lungentumormodells, untersucht werden. Bei diesem Modell wird auf das bewusste Einbringen von Tumorzellen in das pulmonale Gefäßbett verzichtet.

4.1.2 K-ras^{LA2}-Lungentumormodell

Das K-ras^{LA2}-Lungentumormodell ist gekennzeichnet durch direkte Entwicklung bösartiger Adenokarzinome in der Lunge infolge einer Überexpression des konstitutiv aktivierten ras-Onkogens. Laut Johnson *et al.* treten bereits ab der ersten Lebenswoche multifokale Tumoren auf, die sich, langsamer als beim LLC1-Lungentumormodell, innerhalb von 150 Tagen zu fortgeschrittenen Adenokarzinomen in der Lunge entwickeln (Johnson *et al.*, 2001). Anhand dieser Tatsache wurde, nach monatlichen echokardiographischen Untersuchungen, das Versuchsende auf 5 Monate festgelegt, um die Auswirkungen dieses spontanen Modells auf das Gefäßsystem der Lunge zu untersuchen.

Um die humane Situation der Lungenkarzinogese, die das Resultat einer Ansammlung diverser genetischer Schäden in vereinzelt Zellen darstellt, besser zu simulieren, wurde bei der Entwicklung dieses Modells die bereits beschriebene „Hit-and-run“-Technik angewandt. Dies ermöglicht es, die, bei traditionellen transgenen Modellen auftretenden, supraphysiologischen Expressionslevel in allen Zellen des Körpers zu vermeiden, indem nur in vereinzelt Zellen des Organismus der letzte Exzisionsschritt zur konstitutiven Aktivierung des K-ras-Onkogens spontan erfolgt (Johnson *et al.*, 2001). Daraus ergibt sich jedoch, dass K-ras-überexprimierende Zellen, neben der Lunge, auch in anderen Organen aufkommen und sich Hautpapillome oder, wie in dieser Arbeit beobachtet, Thymuslymphome entwickeln können. Dies zeugt von einem erhöhten Expressionslevel von K-ras in Organen außerhalb der Lunge.

Nur äußerst selten treten laut Johnson *et al.* bei diesem Modell Metastasen in thorakalen Lymphknoten, Nieren und anderen viszerale Organen auf (Johnson *et al.*, 2001). In Übereinstimmung mit diesen Erkenntnissen konnten auch im durchgeführten Versuch keine Metastasen dokumentiert werden, so dass mit großer Wahrscheinlichkeit von intravasal zirkulierenden Tumorzellen abgesehen werden kann.

Da das K-ras^{LA2}-Lungentumormodell Tumoren einer meist nur geringen Ausdehnung entwickelt, sollte als weiteres Tumormodell in der zu beschreibenden Arbeit ein Mausmodell mit einem umfangreichen Tumor-Areal, im Vergleich zum

Nicht-Tumor-Areal, verwendet werden. Dieses Charakteristikum weist das SP-C-c-raf-1-BxB-23-Lungentumormodell auf, dessen Tumorigenese mit einer ausgeprägten Entzündungsreaktion einhergeht. Dies ermöglichte es zu untersuchen, inwiefern ein durch die Tumoren quantitativ stärker betroffenes Lungengewebe befähigt ist, den pulmonalarteriellen Druck zu verändern.

4.1.3 SP-C-c-raf-1-BxB-23-Lungentumormodell

SP-C-c-raf-1-BxB-23-Mäuse zeichnen sich, im Gegensatz zu den bereits erwähnten Modellen, dadurch aus, dass sie gutartige Adenome ohne jegliche Metastasierungstendenz ausbilden (Kerkhoff *et al.*, 2000). Zudem ermöglicht die Bindung des Transgens an den SP-C-Promotor eine spezifische Überexpression von c-raf in Typ II Pneumozyten und eine Subpopulation von bronchialen Clara-Zellen (Glasser *et al.*, 1991; Perl *et al.*, 2002). Dies konnte auch in Expressionsstudien von Kerkhoff *et al.* bestätigt werden, wobei zusätzlich geringe Mengen dieser onkogenen Kinase in den Nieren nachgewiesen wurden.

Es entwickeln sich bei diesen Mäusen mit pulmonaler Überexpression des permanent aktiven c-raf in 5-7 Monaten konfluente, gutartige Tumoren (Kerkhoff *et al.*, 2000). Da diese heterozygoten Tiere eine Lebenserwartung von etwa 16 Monaten aufweisen und da, durch das Vorhandensein gutartiger Adenome ohne Gefahr der Metastasierung, keine größeren Belastungen zu erwarten sind, wurde das Versuchsende nach monatlichen echokardiographischen Untersuchungen auf 9 Monate festgelegt.

4.2 Auswirkung der Lungentumoren auf die Hämodynamik

Zur Beurteilung der Hämodynamik bei Lungentumor-beherbergenden Mäusen, dienen die, mittels invasiver Rechtsherzkatheterisierung erhobenen rechtsventrikulären systolischen und systemisch arteriellen Drücke, sowie das in echokardiographischen Sitzungen dargestellte Herzminutenvolumen.

In der Diagnostik der pulmonalen Hypertonie gilt die Rechtsherzkatheterisierung als Goldstandard und sollte daher auch in dieser Arbeit zum Nachweis eines möglichen angestiegenen pulmonalarteriellen Drucks Anwendung finden. Die Rechtsherzkatheterisierung ermöglicht es zudem, Patienten in die Klassifikation der pulmonalen Hypertonie einzuordnen, sowie das Ausmaß der hämodynamischen Beeinträchtigung genau zu ermitteln (Rosenkranz *et al.*, 2011). Empfehlungen geben an, diese Technik bei pulmonalen Überdruckpatienten 3-4 Monate nach Beginn einer neuen Therapie, sowie bei klinischer Verschlechterung anzuwenden (Galie *et al.*, 2009a). Im Mausmodell ist die Rechtsherzkatheterisierung mit Messung des rechtsventrikulären systolischen Drucks zum Nachweis und zur Quantifizierung der pulmonalen Hypertonie gut etabliert (Song *et al.*, 2008; Medoff *et al.*, 2009; Steiner *et al.*, 2009; Thibault *et al.*, 2010). Nachteile bestehen darin, dass es sich bei der Rechtsherzkatheterisierung um eine invasive Technik handelt, die mit einem erhöhten Mortalitäts- und Morbiditätsrisiko einhergeht z.B. durch Hämatoeme und Pneumothorax (Vonk-Noordegraaf und Galie, 2011).

Alle drei verwendeten Mausmodelle verzeichneten einen signifikanten Anstieg des rechtsventrikulären Drucks. Identisch mit dem systolischen pulmonalarteriellen Druck bei funktionell intakter Pulmonalklappe (Rosenkranz *et al.*, 2011), gibt es für diesen Parameter, anders als für den mittleren pulmonalarteriellen Druck, keine klare Definition, ab wann eine pulmonale Überdruckerkrankung vorliegt. Je nach Autor werden beim Menschen systolische pulmonalarterielle Druckwerte u.a. ab 30 mmHg (Chang *et al.*, 2007), 35 mmHg (Grapsa *et al.*, 2007; Vonk *et al.*, 2007) oder 39 mmHg (Zimbarra Cabrita *et al.*, 2010) als pulmonale Hypertonie bezeichnet. Ein ähnlich divergierendes Bild liefern die Literaturangaben zu den Schwellenwerten des rechtsventrikulären Drucks im Mausmodell. So wurden bei

Thibault *et al.* rechtsventrikuläre Drücke von über 32 mmHg als pathologisch erhöht angesehen, wobei Song *et al.* Drücke über 22 mmHg als hyperten bezeichnen (Song *et al.*, 2008; Thibault *et al.*, 2010). Die, in der hier zu besprechenden Studie, ermittelten Drücke rangieren in einem ähnlichen Wertebereich wie die von Song *et al.*. Als möglicher Grund für die vorherrschende Diskrepanz im Mausmodell kann die verwendete Narkose genannt werden. Wobei die von Thibault *et al.* angewandte Anästhesie auf einer Kombination von Ketamin (120 mg/kg) und Fentanyl (200 µg/kg) basiert, wurde in unserer Studie ein Gemisch aus Ketamin (60 mg/kg) und Xylazin (5 mg/kg) injiziert, sehr ähnlich der Injektionsnarkose von Song *et al.* (90 mg/kg Ketamin; 6 mg/kg Xylazin). Als Analgetikum und α_2 -Rezeptoragonist bedingt Xylazin durch Stimulation zentraler prä- und postsynaptischer α -Rezeptoren im Bereich des Kreislaufzentrums eine Senkung des Sympathikotonus mit damit verbundener Blutdruckabnahme und eine Abnahme der Sympathikuswirkung am Herzen mit Senkung der Herzerregbarkeit und Bradykardie (Löscher *et al.*, 2006). Bereits kleine Mengen an α_2 -Agonisten führen bei Mäusen zu diesem kardiodepressiven Effekt (Zuurbier *et al.*, 2002). Opioide hingegen, zu denen Fentanyl gehört, verursachen nur geringe kardiovaskuläre Nebenwirkungen. Niedrig dosiertes Fentanyl bewirkt lediglich ein leichtes Absinken der Herzfrequenz über einen verstärkten Vagotonus (Larsen, 1999). Nur in starker Überdosierung werden bei der Maus durch Fentanyl Bradykardien und Tonusabsenkung der Gefäßmuskulatur mit Hypotonie beobachtet (Jurna, 1992). Diese Tatsache dürfte die geringeren gemessenen Drücke unter kombinierter Ketamin/Xylazin-Narkose erklären.

K-ras^{LA2}- und SP-C-c-raf-1-BxB-23-Modell zeigten keine Veränderungen des systemisch arteriellen Blutdrucks. Die Messung des systemisch arteriellen Drucks im LLC1-Lungentumormodell hingegen ging mit einem deutlichen Absinken des Drucks einher. Diese Erkenntnis dürfte mit großer Wahrscheinlichkeit mit der zu Versuchsende deutlichen Verschlechterung des Allgemeinbefindens beim LLC1-Lungentumormodell mit Gewichtsverlust, erhöhter Atemfrequenz mit abdominal betonter Atmung und Bewegungseinschränkung einhergehen. Berücksichtigt man zudem die Tatsache, dass der systemisch arterielle Blutdruck durch das Produkt aus Herzminutenvolumen und Widerstand des peripheren Gefäßbetts bestimmt

wird, kann das echokardiographisch ermittelte Herzminutenvolumen Aufschluss hinsichtlich dieser Diskrepanz zwischen den drei Lungentumormodellen liefern (Tobias *et al.*, 2008). So sank das Herzminutenvolumen bei allen Modellen im Laufe des Versuchsverlaufs deutlich, wobei zu Versuchsende die LLC1-Mäuse sogar nur halb so hohe Werte aufwiesen wie K-ras^{LA2}- und SP-C-c-raf-1-BxB-23-Mäuse. Anhand dieser Erkenntnis kann das deutliche Absinken des systemisch arteriellen Drucks beim LLC1-Lungentumormodell erklärt werden. Die Funktion des Herzminutenvolumens besteht darin die Sauerstoffaufnahme, den Sauerstofftransport und letztlich die Sauerstoffversorgung der Organe zu gewährleisten. Daraus resultiert dessen große Bedeutung bei der Prognosestellung bei pulmonalen Überdruckpatienten (Sitbon *et al.*, 2002; Wensel *et al.*, 2002). Ursachen für die Reduktion des Herzminutenvolumens beruhen auf dem, bei pulmonaler Hypertonie beobachteten, rechtsventrikulären Funktionsverlust infolge erhöhter Nachlast und dadurch ansteigender rechtsventrikulärer Kontraktionszeit und ventrikulärer Asynchronie mit linkswärtiger Verlagerung des interventrikulären Septums (Vonk-Noordegraaf *et al.*, 2005; Gan *et al.*, 2006; Marcus *et al.*, 2008; Mauritz *et al.*, 2011). Als Konsequenz ist die Füllung des linken Ventrikels vermindert, was zusammen mit der systolischen und diastolischen Dysfunktion des rechten Ventrikels zu der markanten Abnahme des Herzminutenvolumens führt, wie sie in allen drei durchgeführten Lungentumormodellen nachzuweisen war (Vonk-Noordegraaf und Galie, 2011).

Um den Einfluss eines erniedrigten systemisch arteriellen Drucks auf den rechtsventrikulären Druck zu umgehen, kann der rechtsventrikuläre Blutdruck in ein Verhältnis zum Herzminutenvolumen gesetzt werden, um den totalen pulmonalen Widerstand wiederzugeben. Alle drei untersuchten Lungentumormodelle, ob maligne oder benigne, wiesen einen deutlich erhöhten totalen pulmonalen Widerstand auf. Er berechnet sich, wie bei Hoit *et al.*, als Quotient des systolischen pulmonalarteriellen Drucks (oder rechtsventrikulärem systolischen Druck bei intakter Pulmonalklappe) und des Herzminutenvolumens und stellt die Summe aus dem Gefäßwiderstand der Lungenstrombahn und dem Füllungswiderstand des linken Ventrikels dar (Hoit *et al.*, 2005; Kovacs *et al.*, 2009). Laut D'Alonso *et al.* besitzt er eine gute prognostische Aussagekraft bei der

pulmonalen Hochdruckerkrankung (D'Alonzo *et al.*, 1991). Der totale pulmonale Widerstand dient der Abschätzung des pulmonalvaskulären Widerstandes, dessen Anstieg aus hämodynamischer Sicht als Ursprung der pulmonalen Hypertonie gilt (Rosenkranz *et al.*, 2011). Ein erhöhter pulmonalvaskulärer Widerstand führt nämlich zu einem kompensatorischen Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks und bewirkt im Laufe der Erkrankung eine Volumenbelastung des rechten Ventrikels, der sich eine Rechtsherzhypertrophie und -dilatation anschließt.

4.3 Auswirkung der Lungentumoren auf die kardiale Funktion

Während bei pulmonaler Hypertonie der pulmonale Gefäßumbau primär die Ursache für den Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks darstellt, ist es v.a. der rechtsventrikuläre Funktionsverlust infolge erhöhter Nachlast, der mit der Schwere der Symptomatik und dem Überleben der Patienten in Verbindung gebracht wird. Um eine mögliche Beeinflussung der kardialen Struktur und Funktion bei den drei Mausmodellen zu untersuchen, wurde sowohl eine invasive Messung der Rationes des rechten Ventrikels wie auch die Echokardiographie und histologische Messung des Kollagengehalts des rechten Ventrikels durchgeführt.

Die Entnahme des Herzens, nach invasiver Messung der hämodynamischen Parameter und anschließender Abtrennung des rechten Ventrikels vom linken Ventrikel mit dem Septum, ermöglichte es das Gewicht des rechten Ventrikels ins Verhältnis zum Gewicht des linken Ventrikels plus Septum zu setzen. Als weiterer Parameter wurde das Gewichtsverhältnis des rechten Ventrikels zum Körpergewicht berechnet. Während die beiden malignen Lungenkrebsmodelle in den zwei gemessenen Rationes keine Gewichtszunahme des rechten Ventrikels aufwiesen, stellte sich dieser im SP-C-c-raf-1-BxB-23-Modell signifikant vergrößert dar, sowohl im Verhältnis zum Körpergewicht als auch zum Gewicht des linken Ventrikels plus Septum. Diese Gewichtszunahme des rechten Ventrikels ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf den angestiegenen pulmonalarteriellen Druck und die dadurch erhöhte rechtsventrikuläre Nachlast zurückzuführen. Der rechte Ventrikel besitzt nämlich die Fähigkeit sich schnell an Veränderungen der Volumenlast zu adaptieren, aufgrund der dünneren Wand und der halbmond-

förmigen Gestalt, die ihm eine größere Nachgiebigkeit verleihen im Vergleich zum linken Ventrikel (Chin *et al.*, 2005). Nach dem Laplace'schen Gesetz führt eine Verstärkung des intraluminalen Drucks einer dünnwandigen Sphäre zu einem Anstieg des Wandstress, es sei denn die Wand der Kammer nimmt an Dicke zu und der interne Radius verkleinert sich (Bogaard *et al.*, 2009). Auf diese Weise erfolgt, durch konzentrische Umbauprozesse des rechten Ventrikels, eine verstärkte systolische Kontraktionskraft, die es ermöglicht, als Reaktion auf die erhöhte Nachlast, das Herzminutenvolumen zunächst konstant zu halten (Handoko *et al.*, 2010). Steigende systolische und diastolische ventrikuläre Drücke führen somit über erhöhte diastolische und systolische Dehnung zu einer adaptativen Hypertrophie (Bogaard *et al.*, 2009).

Die Tatsache, dass diese adaptive Hypertrophie lediglich im SP-C-c-raf-1-BxB-23-Modell nachgewiesen werden konnte, kann auf mehreren Faktoren beruhen. So wies dieses gutartige Modell die höchsten rechtsventrikulären Drücke auf, so dass bei diesem Modell mit der größten Nachlast zu rechnen ist. Mögliche Unterschiede zwischen den beiden malignen und dem benignen Tumormodell betreffen ebenfalls die Tumorverteilung. Die Adenome entwickeln sich in multipler Weise und betreffen große Teile der Lungenflügel. Ebenso stellt sich im benignen Modell der induzierte Entzündungsprozess als bedeutend dar, so dass die unbeteiligten Gefäße im Nicht-Tumor-Areal in der Minderheit lagen. Obwohl das K-ras^{LA2}-und LLC1-Lungentumormodell maligne, invasiv wachsende Adenokarzinome ausbilden, wiesen diese zu Versuchsende weniger betroffenes Lungengewebe auf. Die Anzahl der durch die initiiierende Läsion betroffenen Gefäße stellt einen wichtigen prognostischen Parameter dar. So wird geschätzt, dass 80% der gesamten pulmonalvaskulären luminalen Fläche betroffen sein müssen, um eine Hypertonie in der *Arteria pulmonalis* und eine rechtsventrikuläre Hypertrophie auszulösen (Stenmark *et al.*, 2009). Außerdem wiesen die SP-C-c-raf-1-BxB-23-Mäuse zu Versuchsende, nach 8 Monaten, das höchste Alter auf. In der humanen Situation wird mit einer minimalen zweimonatigen Erhöhung des pulmonalarteriellen Drucks gerechnet, um eine myokardiale Hypertrophie als Antwort auf Überdruckverhältnisse im pulmonalarteriellen Gefäßbett zu induzieren (Kane *et al.*, 1975). Auf diese Weise kann die fehlende Hypertrophie im nur 18

Tage andauernden LLC1-Lungentumormodell erklärt werden. Dem steht jedoch die Tatsache gegenüber, dass durchaus in Tiermodellen der pulmonalen Hypertonie, in ähnlichen Zeiträumen, eine Hypertrophie erreicht werden kann, wie z.B. im 21-tägigen Versuch der chronischen Hypoxieexposition bei Ratten mit Injektion des VEGF-Rezeptor-Antagonisten SU5416 (Lang *et al.*, 2012). Eine weitere mögliche Erklärung bietet der rasche Fortschritt des Krankheitsgeschehens bei Lungenkrebs. Die malignen Tumoren, als auslösende Stimuli, zeigen im Versuch ein deutlich schnelleres Wachstum und dürften somit schneller ansteigende Druckverhältnisse in der *A. pulmonalis* aufzeigen. Steigt die Nachlast nämlich weiter an, bzw. bleibt zu lange bestehen, nimmt die kardiale Kontraktionskraft ab, aufgrund funktioneller, struktureller oder numerischer Veränderungen in den Kardiomyzyten (z.B. durch Apoptose), so dass der rechte Ventrikel dilatiert. Die Dilatation resultiert in einer erhöhten Wandspannung, induziert einen erhöhten Sauerstoffbedarf des Myokards und beeinträchtigt somit die rechtsventrikuläre Perfusion. Dies endet in einem Teufelskreis mit sich verstärkender Dilatation und verschlechternder Kontraktilität. Zudem wird der Prozess durch nicht-adaptierte neurohormonale Signale, Bildung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies, sowie überschießende Entzündungsreaktion beschleunigt (Bogaard *et al.*, 2009). So ist es vorstellbar, dass die K-ras^{LA2}- und LLC1-Lungentumormodelle zu Versuchsende diese vollständig dekompenzierte Form der Rechtsherzdilatation bereits aufwiesen, wobei SP-C-c-raf-1-BxB-23-Lungentumormodelle im Krankheitsverlauf weniger fortgeschritten waren. Hinweise darauf ergeben sich aus den echokardiographischen Untersuchungen.

Obwohl die echokardiographische Ausmessung des rechtsventrikulären Diameters in allen drei Mausmodellen eine signifikante Rechtsherzdilatation ergab, gibt es zu bemerken, dass der rechte Ventrikel im SP-C-c-raf-1-BxB-23-Modell, entsprechend der insgesamt deutlich umfangreicheren Körpergröße, die geringste Dilatation aufwies. Eine rechtsventrikuläre Dilatation geht oft einher mit Veränderungen der Lage und der Orientation des Herzens, wie auch in dieser Arbeit vereinzelt bei Mäusen des LLC1-Lungentumormodells beobachtet werden konnte (Badano *et al.*, 2010). Besonderes Interesse galt dem rechtsventrikulären

internen Diameter, da er als prognostischer Parameter bei pulmonalarterieller Hypertonie fungiert (Ghio *et al.*, 2010).

Alle drei Mausmodelle wiesen zudem im Herzminutenvolumen eine signifikant verlängerte isovolumetrische Relaxationszeit auf, wobei im benignen SP-C-c-raf-1-BxB-23-Modell der geringste Anstieg zu verzeichnen war. Dieser Parameter beweist daher nicht nur eine beeinträchtigte diastolische Relaxationsfunktion des rechten Ventrikels aller drei Lungentumormodelle, sondern ermöglicht ebenfalls eine Einschätzung der Druckverhältnisse in der pulmonalen Zirkulation, da er in einem linearen Zusammenhang mit dem pulmonalarteriellen systolischen Druck steht (Chang *et al.*, 2007).

Die Messung der systolischen Bewegung des Trikuspidalanulus verdeutlichte eine signifikant beeinträchtigte, systolische Kontraktionsfähigkeit des rechten Ventrikels im K-ras^{LA2}- und LLC1-Lungentumormodell. Eine nicht signifikante systolische Funktionsminderung konnte ebenfalls im SP-C-raf-1-BxB-23-Modell verzeichnet werden. TAPSE erfasst die longitudinale Bewegung des lateralen trikuspidalen Annulus in Richtung rechtsventrikulärem Apex und korreliert mit der ventrikulären systolischen Funktion (Vonk-Noordegraaf und Galie, 2011). TAPSE stellt einen prognostischen Indikator bei pulmonalarterieller Hypertonie dar (Howard, 2011). Limitierungen der TAPSE betreffen Patienten mit signifikanter trikuspidaler Regurgitation oder Fälle mit einer beeinträchtigten linksventrikulären Funktion (Hsiao *et al.*, 2006a; Lopez-Candales *et al.*, 2006).

Als Maß zur Beurteilung der globalen, sowohl systolischen wie auch diastolischen, Funktion des Herzens, wurde der mit dem Tissue Doppler Imaging erfasste myokardiale Leistungsindex des rechten Ventrikels gemessen. Dieser errechnet sich aus dem Quotienten der isovolumetrischen Kontraktionszeit plus isovolumetrischen Relaxationszeit und der gesamten Ejektionszeit der rechten Kammer. Sowohl die an malignen Tumoren als auch die an benignen Neoplasien leidenden Mäuse wiesen signifikant erhöhte Werte des RV MPI auf, was einer deutlichen Beeinträchtigung der globalen Funktion des rechten Ventrikels entspricht. Dem RV MPI wird nämlich eine hohe Sensitivität bei der Detektion abnormaler rechtsventrikulärer Funktionen zugeschrieben (Miller *et al.*, 2004). Zudem konnte gezeigt werden, dass RV MPI gut mit invasiven Verfahren, wie der

Katheterisierung, korreliert, um die Schwere der pulmonalen hypertonen Erkrankung zu reflektieren (Su *et al.*, 2007).

Weitere Vorteile dieses Parameters betreffen die gute Reproduzierbarkeit und die Unabhängigkeit von der rechtsventrikulären Geometrie (Hsiao *et al.*, 2006b; Zimbarra Cabrita *et al.*, 2010). Limitierte Anwendung findet der RV MPI aufgrund seiner hohen Sensitivität bei verändertem Volumenstatus des Patienten und bei Tachykardie (Vonk-Noordegraaf und Galie, 2011). Schließlich dient der RV MPI ebenso als Prognosekriterium bei Patienten mit einer pulmonalen Hypertonie (Yeo *et al.*, 1998; Grapsa *et al.*, 2007).

Das angewandte echokardiographische Verfahren ermöglicht, als nicht-invasives, bildgebendes Verfahren, die Bewertung der rechtsventrikulären Struktur und Funktion und findet seine tagtägliche Anwendung in der initialen Bewertung von Patienten mit Verdacht auf pulmonale Hypertonie, im Screening von Risikopatienten und in den Verlaufskontrollen (Hachulla *et al.*, 2005; Galie *et al.*, 2009b). Der Vorteil dieser nicht-invasiven Technik besteht darin, auf die, mit einem erhöhten Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko einhergehende, Rechtsherzkatheterisierung verzichten zu können (Vonk-Noordegraaf und Galie, 2011). Zudem ist sie eine etablierte Methode, die weithin verfügbar und günstig ist. Jedoch ist das Verfahren abhängig von der Erfahrung der durchführenden Person und je nach Habitus, sowie in einigen klinischen Situationen, wie z.B. bei Lungenemphysem schwierig durchzuführen (Vonk-Noordegraaf und Galie, 2011). Dieses nicht-invasive Verfahren sollte in dieser durchgeführten Studie zur Verlaufskontrolle der kardiovaskulären Situation der Lungentumormäuse seine Anwendung finden.

Die histologische Färbung nach Sirius-Red ermöglicht eine weitere Beurteilung des rechten Ventrikels hinsichtlich seines Gesamtkollagengehalts. Der Vorgang der rechtsventrikulären Hypertrophie kennzeichnet sich nämlich durch eine Vergrößerung der Kardiomyozyten, infolge erhöhter RNA- und Proteinbiosynthese, mit Vermehrung der Sarkomere und einer gesteigerten Synthese von extrazellulärer Matrix, v.a. Kollagen (Böcker *et al.*, 2004; Bogaard *et al.*, 2009). Tatsächlich verursacht die erhöhte Nachlast, welcher der rechte Ventrikel ausgesetzt ist, im Rahmen der pulmonalen Überdruckerkrankung, eine Aktivierung

von Fibroblasten im Myokard (Lourenco *et al.*, 2006; Gautier *et al.*, 2007). Dieser Effekt konnte in allen untersuchten Mausmodellen nachvollzogen werden, bei denen eine signifikante Erhöhung des Gesamtkollagengehalts des rechten Ventrikels demonstriert wurde. Ähnliche myokardiale Fibrosen werden ebenfalls in anderen Tiermodellen der pulmonalen Hypertonie, wie dem Monocrotalin-induzierten Rattenmodell und nach chronischer Hypoxieexposition mit Injektion des VEGF-Rezeptor-Antagonisten SU5416 nachgewiesen (Hadi *et al.*, 2010; Lang *et al.*, 2012). Die Folgen dieses Anstiegs des Gesamtkollagengehalts erstrecken sich zunächst auf den strukturellen, myokardialen Umbau, da das Kollagen die einzelnen Myozyten, Myofibrillen, Muskelfasern und -bündel als Netzwerk umgibt und durch vermehrte Ablagerung ein Versteifen des rechten Ventrikels mit sich zieht (Bogaard *et al.*, 2009; Hadi *et al.*, 2010). Zudem fällt der extrazellulären Matrix die Rolle zu, das Milieu für die elektrische Leitung zu schaffen. Ist sie, wie im Falle der rechtsventrikulären Hypertrophie, inhomogen verteilt, bestehen Prädispositionen für Arrhythmien, die sowohl zu systolischem, wie auch diastolischem Herzversagen führen können (Khan und Sheppard, 2006). So konnten Arrhythmien auch in der durchgeführten Studie im Rahmen der echokardiographischen Untersuchungen bei vereinzelt Mäusen des LLC1- und SP-C-c-raf-1-BxB-23-Lungentumormodells nachgewiesen werden.

Anders als das SP-C-c-raf-1-BxB-23-Lungentumormodell, zeigt das K-ras^{LA2}-Mausmodell keine lungenspezifische Expression von konstitutiv aktivem ras, sondern ermöglicht spontan in jedem Zelltypen, durch intrachromosomale Rekombination oder durch ungleichen Austausch von Schwesterchromatiden, die Überexpression von ras, was u.a. auch zur Ausbildung von Thymuslymphomen führen kann.

Da konstitutiv aktives ras-Protein die Zellregulation und -vermehrung fördert und Zellwachstum ebenso eine Rolle bei Rechtsherzhypertrophie spielt, ist ein direkter Beitrag zur Rechtsherzhypertrophie durch lokale Überexpression von ras in Kardiomyozyten vorstellbar. Somit wäre die rechtsventrikuläre Reaktion während des Krankheitsverlaufs möglicherweise nicht nur auf eine Erhöhung des pulmonal-arteriellen Drucks und der rechtsventrikulären Nachlast beschränkt, sondern durch

Überexpression von K-ras mitbedingt. In der durchgeführten Studie wurde bei den K-ras^{LA2}-Mäusen zu Versuchsende eine Rechtsherzdilatation ohne Hypertrophie nachgewiesen. In der Literatur hingegen wird dem ras-Protein eine fördernde Rolle bei der Ausbildung der kardialen Hypertrophie zugesprochen. So bilden transgene Mäuse mit konstitutiv aktivem ras oder überexprimiertem MEK1, einem Protein der gleichen MAPK-Signaltransduktionskaskade, eine linksventrikulären Hypertrophie aus (Bueno *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2004; Mitchell *et al.*, 2006). Herzspezifische *raf-1* ^{-/-} Knock-out-Mäuse weisen hingegen eine systolische Dysfunktion, Herzdilatation und normal große Kardiomyozyten auf (Mikula *et al.*, 2001; Hindley und Kolch, 2002; Yamaguchi *et al.*, 2004). Zudem manifestiert sich in Erkrankungen, wie u.a. dem Noonan-Syndrom oder dem Cardio-Fazio-Cutanen-Syndrom, die mit autosomal dominanten Mutationen in positiven Regulatoren des MAPK-Weges einhergehen, eine hypertrophe Kardiomyopathie (Pandit *et al.*, 2007; Kontaridis *et al.*, 2008).

Dieser hypertrophe Effekt konnte jedoch in dem zu beschreibenden K-ras^{LA2}-Lungentumormodell nicht nachgewiesen werden, so dass entweder von einem zu vernachlässigenden kardialen Effekt von K-ras oder aber einem katalysierenden Effekt auszugehen ist. Als Konsequenz eines beschleunigenden Beitrags zur rechtsventrikulären Hypertrophie, mit einhergehender interstitieller Fibrose und myokardialer Steifheit, wird das kritische Herzgewicht schneller erreicht. Das kann zur nachgewiesenen Rechtsherzdilatation und -versagen mit Apoptose führen, so dass nach erfolgter Entnahme des Herzens und Bestimmung der Masse keine Hypertrophie mehr nachweisbar war.

4.4 Auswirkung der Lungentumoren auf die Blutoxygenierung und den Hämatokrit

Sowohl die beiden malignen Lungenkrebsmodelle, wie auch das benigne SP-C-c-raf-1-BxB-23-Lungentumormodell wiesen keine Veränderungen des Hämatokrits auf, so dass davon auszugehen ist, dass Neoplasien der Lunge, ob maligne oder benigne, das Verhältnis der zellulären Bestandteile des Bluts zum gesamten Blutvolumen nicht beeinflussen. Dem Hämatokrit kommt bei der Untersuchung von Lungenkrebspatienten eine besondere Beachtung zugute, da dieser Parameter, bei Abnahme, Hinweise auf einen metastatischen Verlauf der Erkrankung liefert (Silvestri *et al.*, 1995). Die Entwicklung der Lungentumoren an sich geht somit mit keiner signifikanten Veränderung des Hämatokrits einher. Die Entwicklung von pulmonaler Hypertonie wird ebenfalls, wie von Meyrick *et al.* im Ratten-Monocrotalinmodell bewiesen, nicht von signifikanten Veränderungen des Hämatokrits begleitet (Meyrick *et al.*, 1980), es sei denn Versuchstiere werden chronischer Hypoxie ausgesetzt, um pulmonale Hypertonie auszulösen (Geraci *et al.*, 1999).

Anders verhält es sich mit dem arteriellen Sauerstoffpartialdruck in entnommenem Blut der *A. carotis communis*. Alle untersuchten Lungentumormodelle zeigten einen signifikant verringerten, der Sauerstofffraktion zuzuordnenden Teildruck am Gesamtdruck. Die Veränderung des arteriellen Sauerstoffpartialdrucks stellt einen sensiblen Indikator dar, der es ermöglicht chronische pulmonale Erkrankungen nachzuweisen, die den Gasaustausch betreffen (Hong *et al.*, 2010). Fast alle pulmonalen Erkrankungen höheren Schweregrades werden von einer empfindlich gestörten Homöostase zwischen Ventilation und Perfusion begleitet (Siegenthaler und Blum, 2006). Lungenkrebspatienten weisen eine solche Störung von Ventilation und Perfusion, infolge von COPD, pneumonischen Arealen, Atelektasen und arterieller Obstruktion auf (Hong *et al.*, 2010). In einer ähnlichen Weise zeigen pulmonale Überdruckpatienten einen niedrigen P_{aO_2} (Springhouse, 2002). Die arteriellen Blutgase stellen zudem exzellente Prediktoren für das Vorhandensein von sekundärer pulmonaler Hypertonie dar. Hypoxämie, mit einem

Abfall des P_{aO_2} unter 50 mmHg in Kombination mit einem Anstieg des P_{aCO_2} über 45 mmHg, repräsentiert nämlich eine wichtige Voraussetzung für das Auftreten von pulmonaler Hypertonie bei Patienten mit COPD oder zystischer Fibrose (Irwin und Rippe, 2007).

Eine Senkung des P_{aO_2} , wie in der durchgeführten Arbeit nachgewiesen, beruht auf einer Störung des Verhältnisses von Ventilation zu Perfusion, auch Verteilungsstörung genannt. Sinkt, wie zu beobachten im Falle des LLC1-Lungentumormodells, neben dem P_{aO_2} auch der P_{aCO_2} , spricht man von einer Partialinsuffizienz (Siegenthaler und Blum, 2006). Sie tritt auf in Situationen, in denen der alveoläre Sauerstoffpartialdruck in der erkrankten Region abfällt und der Kohlenstoffdioxidpartialdruck in der Alveole und der Pulmonalvene zunächst ansteigt. Reflektorisch wird eine Hyperventilation eingeleitet, die zwar den hervorgerufenen P_{aO_2} -Abfall nicht beseitigen kann, jedoch die Hyperkapnie kompensiert bzw. abfallen lässt (Siegenthaler und Blum, 2006). Sie tritt sowohl bei Erkrankungen des Lungenparenchyms und Atelektasen auf, als auch bei Thrombosen sowie anderen schweren Lungenembolien, wie sie im LLC1-Lungentumormodell bewusst durch intravenöse Injektion von LLC1-Zellen hervorgerufen wurden (Nelson und Couto, 2006).

Im Gegensatz dazu stehen die K-ras^{LA2}- und SP-C-c-raf-1-BxB-23-Lungentumormodelle, die einen Anstieg des P_{aCO_2} verzeichneten. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um eine respiratorische Globalinsuffizienz, Ausdruck einer chronischen, ventilatorischen Insuffizienz. Sie ist dadurch gekennzeichnet, dass die auf den abfallenden P_{aO_2} einsetzende Hyperventilation beeinträchtigt ist und die Hyperkapnie daher, anders als bei der Partialinsuffizienz, nicht beseitigt werden kann. Zudem kann primär eine Hypoventilation vorliegen, die sekundär zu Hypoxämie führt (Siegenthaler und Blum, 2006). Gründe hierfür sind, neben zentraler und peripherer nervaler Störungen und Beeinträchtigungen der Atemmuskulatur und Thoraxwand, auch Obstruktionen der v.a. kleinen Atemwege und Behinderungen der Lungenexpansion (Siegenthaler und Blum, 2006). Letztere werden mit großer Wahrscheinlichkeit durch das exponentielle Lungentumorwachstum induziert. Die Blutgasparameter spiegeln daher die, durch das stetige Lungentumorwachstum und die damit verbundene Hypoventilation,

hervorgerufene Hypoxämie wider. Somit kann vermutet werden, dass in einer ähnlichen Weise, wie bereits für Patienten mit COPD oder zystischer Fibrose bewiesen (Irwin und Rippe, 2007), eine Hypoxämie in Kombination mit Hyperkapnie zur Entwicklung von pulmonaler Hypertonie bei Lungentumorpatienten beitragen kann.

In venösem Blut, entnommen aus der *V. jugularis externa*, konnten bei allen drei Mausmodellen ein vergleichbarer Abfall des P_vO_2 und eine gleichbleibende Tendenz des P_vCO_2 nachgewiesen werden. Die sich einstellenden niedrigen O_2 -Teildrücke im venösen Blut sind auf die unveränderte O_2 -Entnahme durch die Gewebe im Verlauf einer Kapillarpassage zurückzuführen. Da der O_2 -Ausgangswert im arteriellen Blut signifikant erniedrigt ist, stellt sich der Sauerstoffpartialdruck im venösen Blut nach Gewebepassage in den Lungentumormäusen ebenfalls erniedrigt dar. Der untersuchte P_vO_2 entspricht dabei dem gemischt-venösen O_2 -Partialdruck, der durch Zusammenfluss des venösen Bluts aus unterschiedlichen Organen entsteht (Brinkmann und Madea, 2003).

4.5 Auswirkung der Lungentumoren auf die Gefäßmorphometrie

Die Untersuchung der Gefäßmorphometrie, welche die Erfassung der medialen Wandstärke und des Muskularisierungsgrads beinhaltet, ermöglicht es die morphologischen Charakteristika der pulmonalarteriellen Hypertonie in humanen wie auch murinen Lungenschnitten zu bestimmen. Zu diesen Attributen gehören das vaskuläre Remodeling, die Vasokonstriktion und die Bildung von In-Situ-Thromben (Mandegar *et al.*, 2004). Der derzeitige Kenntnisstand über diese bei pulmonaler Hypertonie auftretenden Gefäßveränderungen ist noch gering. Jedoch ist davon auszugehen, dass sie durch Erhöhung der Scherkräfte in den pulmonalen Gefäßen einen entscheidenden Beitrag zu einem ständig ansteigenden pulmonalarteriellen Druck leisten.

Die mediale Wandstärke dient der Erfassung der bei den Gefäßumbauprozessen beobachteten medialen und intimalen Hypertrophie. Sowohl in den entnommenen Mauslungen, wie auch bei den humanen Proben, konnte in jeder untersuchten Gefäßkategorie ein signifikanter Anstieg der medialen Wandstärke im Tumor-Areal, im Vergleich zum unbetroffenen Nicht-Tumor-Areal detektiert werden. Während beim Menschen dieser Zuwachs ebenso auf Veränderungen der Intima durch markante Neointimaformation, wie auch auf eine Mediaverdickung zurückzuführen war, fehlen in den präparierten Mauslungen die typischen okklusiven Endothelzellwucherungen, so dass die erhöhte Wandstärke allein auf der Vergrößerung der Media beruht.

Die Zunahme der Mediadicke ist hauptsächlich auf die Einwanderung und Proliferation glattemuskulärer Zellen, sowie auf eine vermehrte Ablagerung extrazellulärer Matrix zurückzuführen (Mandegar *et al.*, 2004). Diese Einwanderung von Myofibroblasten, nach endothelial-mesenchymaler Transition aus Endothelzellen oder durch Transdifferenzierung von adventitialen Fibroblasten bzw. zirkulierenden Fibrozyten, bewirkt nicht nur das Verdicken der Media, sondern ebenfalls die *de novo* Muskularisierung zunächst unmuskularisierter Gefäße (Frid *et al.*, 2006; Stenmark *et al.*, 2006; Morrell *et al.*, 2009). Dieses Phänomen wurde ebenfalls in den untersuchten Lungentumorproben nachgewiesen. So zeigte sich

in den pulmonalen Gefäßen der kleinsten Kategorie in allen Mausmodellen und in den humanen Donorlungen eine deutliche Umverteilung von nicht muskularisierten zu partiell bzw. voll muskularisierten Gefäßen im Tumor-Areal im Verhältnis zum Nicht-Tumor-Areal. Bei den größeren Gefäßkategorien, mit bereits unter physiologischen Umständen stärkerer Muskularisierung und nur sehr geringem Anteil nicht-muskularisierter Gefäße, wurde keine zusätzliche Muskularisierung beobachtet, obwohl, wie bereits erwähnt, die mediale Wandstärke zunahm. Da bei der Vermessung des Muskularisierungsgrades der prozentuale Anteil der α -smooth muscle Aktin-positiven Gefäßwandabschnitte am Gesamtumfang, jedoch nicht die Dicke der sich violett anfärbenden Bereich detektiert wird, ist mit großer Wahrscheinlichkeit, in den mittleren und großen Gefäßen, der nachgewiesene Anstieg der medialen Wandstärke auf die Zubildung zusätzlicher medialer, glatt-muskulärer Schichten der ohnehin bereits stark muskularisierten, großen Gefäße zurückzuführen. Daraus ergibt sich, im Falle der mittleren und großen pulmonalen Gefäße, eine Erklärung für die Zunahme der medialen Wandstärke mit fehlender Steigerung des Muskularisierungsgrads im Tumor-Areal.

Das in der durchgeführten Studie angewendete Verfahren zur Differenzierung in Tumor-Areal und Nicht-Tumor-Areal und deren Vergleich mit Lungen gesunder Kontrollen diente der Lokalisation der umgebauten Gefäße. So wurde es möglich zu unterscheiden, ob das vaskuläre Remodeling, als Anzeichen auf pulmonale Hypertonie, nur lokal in dem durch das Tumorstadium direkt beeinträchtigten Lungengewebe oder aber generell in der gesamten Lunge von Krebspatienten auftritt. Ähnliche histologische Verfahren wurden bereits in der Literatur angewandt: So unterschieden Redente *et al.* das Lungenparenchym in Tumor und „unbeteiligtes“ Gewebe, um nach immunhistochemischer Färbung gegen iNOS und Arginase I, den Gehalt an M1- und M2-Makrophagen in beiden Lokalisationen, sowie zu gesundem Lungenkontrollgewebe, zu vergleichen (Redente *et al.*, 2007). Shimada *et al.* verglichen auf die gleiche Weise die Invasion von Tumorzellen intra- und extratumoraler Gefäße. Bei den extratumoralen Gefäßen wurde auf die klare Lokalisation der Gefäße außerhalb des Primärtumors geachtet (Shimada *et al.*, 2010).

Die kompakten Tumormassen, mit Verlust jeglicher alveolärer Struktur, werden in Kombination mit dem umliegenden verdichteten, entzündeten Lungengewebe als Tumor-Areal zusammengefasst. Die Gefäße des umliegenden Lungengewebes sind nämlich auch am Tumorstoffwechsel beteiligt, indem sie die Blutversorgung der Tumoren bis zu der kritischen Größe von 1-2 mm mit übernehmen. Im SP-C-c-raf-1-BxB-23-Lungentumormodell zeigen die Adenome sogar bei einem Durchmesser von mehr als 1,5 cm eine nur sehr geringe intratumorale Vaskularisierung und eine schwachen Dichte an Gefäßen in der Tumorperipherie (Ceteci *et al.*, 2011). Um daher ein vollständiges Bild der tumorversorgenden Gefäße zu erhalten, wurden sowohl die Gefäße der dichten Tumormasse und des umgebenden entzündeten, alveolären Gewebes als Gefäße des Tumor-Areals bezeichnet.

Bei der histologischen Begutachtung der Schnitte konnte weder bei den murinen, noch bei den humanen Schnitten Thromben, bzw. organisierte Thrombembolien nachgewiesen werden, so dass Blutkoagel als mögliche Ursache einer chronisch thrombembolischen pulmonalen Hypertonie bei Lungenkrebs mit einiger Wahrscheinlichkeit auszuschließen sind. Zudem würden sich in diesem Fall die umgebauten Gefäße nicht auf das Tumor-Areal begrenzen, sondern Gefäße des gesamten Lungenparenchyms betreffen.

Intravasal auftretende Tumorzellen können im LLC1- und im K-ras^{LA2}-Lungentumormodell aufgrund der Malignität der induzierten Tumoren nicht ausgeschlossen werden. Würden diese Tumorzellen Aggregate bilden, wären sie durchaus in der Lage als Tumorzellembolien pulmonale Hypertonie und *Cor pulmonale* auszulösen. Hypothesen über mögliche Pathomechanismen besagen, dass erstens eine Dysregulation von Signaltransduktionswegen als Reaktion auf vorhandene embolische Zellen bzw. auf vaskuläre Verwundungen das vaskuläre Remodeling verursachen kann oder zweitens Embolien durch Obstruktion pulmonaler Arterien den pulmonalen vaskulären Widerstand erhöhen können (Roberts *et al.*, 2003). Erstere Theorie wird unterstützt durch Soares *et al.*, die vorschlugen, dass das Festsetzen zirkulierender Tumorzellen zu einer

Verwundung des Endothels und zur Promotion einer sekundären pulmonalen obliterativen Endarteritis führt (Soares *et al.*, 1993). Zudem soll die Anheftung von Tumorzellen am Endothel die Bildung eines gerinnungsfördernden Milieus auslösen. So würde die Koagulation die Freisetzung von Wachstumsfaktoren bedingen, die die Proliferation von Endothelzellen und Fibroblasten fördern (von Herbay *et al.*, 1990). Tatsächlich wirken jedoch nur etwa 1 % der zirkulierenden Tumorzellen auf das pulmonale Gefäßbett ein (King und Harmon, 1994; Mehrishi *et al.*, 2004). Die Mehrzahl der zirkulierenden malignen Zellen verursachen keine Symptome und etablieren keine metastatischen Herde, da sie von der lokalen Immunantwort der Lunge zerstört werden oder sie den Scherkräften in der Mikrozirkulation, aufgrund ihrer Größe von über 10 µm nicht standhalten (Kvale, 1991; Mehrishi *et al.*, 2004).

Da jedoch aufgrund der Dignität des SP-C-c-raf-1-BxB-23-Lungentumormodells zirkulierende Tumorzellen in diesem Modell mit Sicherheit ausgeschlossen werden können, dieses Modell aber ebenso die mit pulmonalem Hochdruck einhergehenden Symptome aufwies, ist die nachgewiesene pulmonale Hypertonie bei Lungentumorerkrankungen mit großer Wahrscheinlichkeit nicht nur auf das in der Literatur beschriebene intravasale Vorkommen von Tumorzellen in Form von Tumorzellembolien zurückzuführen. Einzig die uterine Leiomyomatose gilt nämlich als gutartiger Tumor, der pulmonale Hypertonie verursachen kann aufgrund seines vaskulären Tropismus mit Invasion der *V. cava inferior* und Obstruktion der pulmonalen Arterien (Dartevelle *et al.*, 2004).

4.6 Mögliche beteiligte Mechanismen

Das angewandte histologische Messverfahren mit Einteilung in Nicht-Tumor- und Tumor-Areal dient der Unterscheidung, ob die Gefäßumbauprozesse nur lokal auftreten oder generalisiert die gesamte Lunge der Krebspatienten betreffen. Auf diese Weise wurde nachgewiesen, dass die morphologischen Charakteristika der pulmonalen Überdruckerkrankung nur in tumorösen Arealen auftreten, jedoch nicht im entfernteren Nicht-Tumor-Areal.

Als mögliche Ursachen für dieses räumlich begrenzt auftretende vaskuläre Remodeling kommen Wachstumsfaktoren in Frage. Humbert *et al.* konnten nämlich nachweisen, dass Wachstumsfaktoren wie u.a. PDGF, bFGF, IGF-1 und EGF in Lungen von Patienten mit pulmonaler Hypertonie hochreguliert vorliegen (Humbert *et al.*, 2004). Da die Veränderungen der Gefäßmorphometrie nur die Gefäße des Tumor-Areals betreffen, dürfte es sich dabei nicht um zirkulierende Wachstumsfaktoren, sondern um lokal wirkende, parakrin sezernierte Wachstumsfaktoren handeln. Immunzellen, als Produzenten einer Vielzahl wachstumsfördernder und chemoattraktiv wirkender Substanzen, drängen sich daher als mögliche Verursacher dieser Veränderungen in den Vordergrund der Überlegungen. Daher wurden T-Lymphozyten, Makrophagen und dendritische Zellen in den Gefäßwänden des Nicht-Tumor-Parts und des Tumor-Parts quantifiziert. Wie bereits in vorangegangenen, unveröffentlichten Studien unserer Arbeitsgruppe bewiesen, stellen T-Lymphozyten, Makrophagen und dendritische Zellen im gesamten Tumor-Areal, bestehend aus dem Tumorparenchym und den dazugehörigen Gefäßen, die häufigsten Immunzellen dar und sollten daher Bestandteil der intramuralen Quantifizierung werden (Ebel, 2012).

T-Lymphozyten verzeichnen eine deutliche Häufung in den Gefäßwänden des Tumor-Areals im Vergleich zum Nicht-Tumor-Areal. Ihr Vorkommen in großen Ansammlungen in der Gefäßadventitia, sowohl im als auch am Rande des Tumorparenchyms, geht einher mit Beschreibungen in der Literatur. So wurden sowohl tumorinfiltrierende T-regulatorische Lymphozyten bei humanen und murinen Lungentumoren, wie auch am Tumorrand gelegene T-Lymphozyten beschrieben (Beer und Malkinson, 1985; Axiotis und Jennings, 1988; Redente *et al.*, 2007).

Das gesteigerte Vorkommen von T-Lymphozyten in den umgebauten Gefäßwänden deutet auf ein Zutun dieser Zellen zum nachgewiesenen vaskulären Remodeling bei Lungentumorpatienten hin. Bei pulmonalen Überdruckpatienten ist ihre Rolle derzeit jedoch wenig geklärt. Stimuliert durch IL-6 wird T-Zellen eine pro-proliferative, inflammative und anti-apoptotische Wirkung auf benachbarte glatte Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen nachgesagt (Steiner *et al.*, 2009). Auch T-Helferzellen scheinen am Gefäßumbauprozess beteiligt zu sein, indem sie in der Lage sind die Proliferation und Differenzierung von glatten Muskelzellen zu fördern, was erneut einen möglichen Beitrag zur Pathogenese der pulmonalen Hypertonie unterstreicht (Daley *et al.*, 2008). Es kann daraus geschlossen werden, dass T-Lymphozyten, durch ihr vermehrtes Vorkommen in umgebauten Gefäßen der Lungenkrebschnitte und aufgrund ihres bereits bei pulmonaler Hypertonie nachgewiesenen Potentials zur Förderung der Proliferation und Differenzierung von Gefäßzellen, am demonstrierten Gefäßumbau in Krebslungen beteiligt sein können.

Ein etwas geringerer Anstieg beim intramuralen Immunzellgehalt konnte bei Makrophagen nachvollzogen werden. Ihre Lokalisation inmitten und in der Peripherie des dichten Tumorgewebes stimmt mit der in der Literatur beschriebenen Verteilung überein. So werden sie vornehmlich in nekrotischen und hypoxischen Arealen, wie auch am Rande des Tumorparenchyms aufgefunden (Li *et al.*, 2007; Redente *et al.*, 2007). Ebenso wie die T-Lymphozyten, können Makrophagen durch ihr erhöhtes Vorkommen in den umgebauten Gefäßen am Remodeling bei Lungenkrebspatienten beteiligt sein. In der Literatur wird nämlich vorgeschlagen, dass Makrophagen bei IPAH-Patienten Thromboxan A₂ bilden und auf diese Weise ihren Beitrag zur beobachteten Vasokonstriktion dieser Patienten leisten (Robbins *et al.*, 2001). Weitere Hinweise dafür, wie Makrophagen in der Lage sind den vaskulären Umbauprozess zu steuern, ergeben sich aus der Tatsache, dass Makrophagen durch Freisetzung von Interleukinen, wie IL-1, und Wachstumsfaktoren, wie TGF- β und TNF an der Verdickung der Media und Adventitia bei pulmonaler Hypertonie beteiligt sind (Polverini *et al.*, 1977; Knighton *et al.*, 1983; Gillespie *et al.*, 1988). Durch die Anhäufung der Makrophagen in den Gefäßwänden des Tumor-Areals und deren in der Literatur beschriebenen

Fähigkeit zum vaskulären Remodeling beizutragen, ergibt sich ebenfalls für diese mononukleären Zellen die Möglichkeit einen Beitrag zum Umbau der Tumorgefäße zu leisten.

Die vaskuläre Quantifizierung der dendritischen Zellen, die sich ebenfalls vermehrt in der Adventitia aufhielten, zeigte keinen Unterschied zwischen Nicht-Tumor- und Tumor-Areal. Ebel konnte jedoch, bei der Bestimmung der Gesamtzahl an dendritischen Zellen, einen Anstieg im gesamten Tumor-Areal nachweisen (Ebel, 2012). Da aber in unserer Studie deren vaskuläre Anzahl im Tumor- und Nicht-Tumor-Areal konstant auf einem niedrigen Niveau blieb, ist von den dendritischen Zellen mit großer Wahrscheinlichkeit im Tumor-Areal kein parakriner Beitrag zu den Gefäßumbauprozessen zu erwarten.

Alle quantifizierten Immunzellen wurden zum überwiegenden Teil in der äußersten Schicht der Gefäßwand, der Adventitia, aufgefunden. Die gleiche bevorzugte Lokalisation konnte bereits bei IPAH-Donorlungen dokumentiert werden. So sammeln sich, bei pulmonaler Hypertonie, Makrophagen und T-Lymphozyten in großen Mengen in der Adventitia pulmonaler Arterien an (Savai *et al.*, 2012). Diese Feststellung könnte die Bedeutung der „outside-in“-Hypothese des vaskulären Remodelings, die bereits bei pulmonaler Hypertonie ihre Anwendung findet, auch bei Lungenkrebs bekräftigen. Diese besagt, dass eine früh erfolgte vaskuläre und über einen längeren Zeitraum andauernde Entzündung zu einer Aktivierung von Immunzellen, Fibroblasten und Vorläuferzellen aus dem Interstitium führt. Diese könnten dann von außen nach innen den Umbau der Adventitia, der Media und schließlich der Intima fördern (Bennaceur *et al.*, 2006). So wurde beispielsweise gezeigt, dass eine frühzeitige und ausgeprägte Ansammlung von mononukleären Entzündungszellen in der Adventitia in kleinen intraazinären Arterien und Venen der Proliferation von glatten Muskelzellen der Media vorangeht (Wilson DM *et al.*, 1989; Wilson DW *et al.*, 1989; Stenmark *et al.*, 2006). Bei pulmonaler Hypertonie besteht somit eine ausgesprochene Korrelation zwischen dem Remodeling und dem Auftreten eines Entzündungsgeschehens (Stenmark *et al.*, 2009). Der Beitrag eines Entzündungsgeschehens zur Pathogenese der pulmonalen Hypertonie wird beispielsweise klar bei der

Betrachtung des Monocrotalin-Modells der Ratte. Nach subkutaner Injektion eines toxischen Pyrrolizidin-Alkaloids aus dem Hülsenfrüchtler *Crotalaria spectabilis* und sich anschließender Biotransformation in der Leber zu Monocrotalin-Pyrrol wird ein Entzündungsprozess der pulmonalen Gefäßwände induziert, der das vaskuläre Remodeling einleitet und den pulmonalarteriellen Druck ansteigen lässt (Stenmark *et al.*, 2009). In den hier zu besprechenden Versuchen liegt jedoch kein Monocrotalin, sondern Lungentumoren als mögliche Auslöser von Entzündung vor.

Ein möglicher Pathomechanismus, über den Lungentumoren die nachgewiesene Entzündung hervorrufen können, stellt Hypoxie dar. Das Vorhandensein multipler hypoxischer Areale repräsentiert ein wichtiges Charakteristikum der meisten soliden Tumoren (Vaupel, 2008). Zudem konnte eine erhöhte Anzahl von Makrophagen in Verbindung mit Hypoxie in malignen Tumoren nachgewiesen werden (Crowther *et al.*, 2001). Andererseits dokumentierten Burke *et al.*, bei pulmonaler Hypertonie, die signifikante Rolle der Entzündung bei Hypoxie-induziertem vaskulären Remodeling (Burke *et al.*, 2009). Daher könnte spekuliert werden, ob die bei Tumoren auftretende lokale Hypoxie als Verursacher einer entzündlichen Reaktion das Bindeglied zwischen dem Vorhandensein von Lungenneoplasien und dem nachgewiesenen Gefäßremodeling darstellt.

Gewebehypoxie stellt sich bei soliden Tumoren ein, infolge von reduziertem Blutfluss aufgrund strukturell und funktionell abnormaler Gefäße, vermehrter Gewebeflüssigkeit im Extrazellularraum und Durchflusswiderstandsanstieg durch Zunahme der Blutviskosität (Vaupel, 2008). Dies geht einher mit einer unzureichenden Versorgung der Tumorzellen mit essentiellen Nährstoffen und Sauerstoff. Beobachtet wird dieses Phänomen meist bei einer Tumorgroße von etwa 1-2 mm und hat eine Hochregulierung von Transkriptionsfaktoren, wie u.a. HIF-1 α zur Folge (Vaupel, 2004; Vaupel, 2008). Diese modulieren die Expression von Genen, wie beispielsweise dem Wachstumsfaktor VEGF, sowie dem Chemokin CXCL12 mit dem Ziel u.a. die Angiogenese und die

Entzündungsreaktion zu fördern (Vaupel *et al.*, 1989; Folkman, 1990; Ryan *et al.*, 2000; Vaupel, 2004; Li *et al.*, 2007).

Auch bei pulmonalen Überdruckpatienten konnte eine lokale, reduzierte Sauerstoffverfügbarkeit z.B. in der Umgebung von plexiformen Läsionen nachgewiesen werden, welche ausreicht, um die HIF- und VEGF-Expression zu steigern (Cool *et al.*, 1999; Tuder *et al.*, 2001). In einer ähnlichen Weise ist eine Hochregulierung von VEGF in mikrodyssezierten pulmonalen Gefäßen von hypoxischen Wistar-Kyoto-Ratten zu detektieren (Burke *et al.*, 2009). Daher ist bei pulmonaler Hypertonie, genauso wie bei soliden Tumoren, die Freisetzung von VEGF u.a. auf die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren unter hypoxischen Bedingungen zurückzuführen.

Die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren erfolgt, unter chronischer Hypoxie, nach vermehrter intrazellulärer Freigabe Speicher-vermittelt regulierter Ca^{2+} -Ionen in humanen Endothelzellen (Fantozzi *et al.*, 2003; Mandegar *et al.*, 2004). Die auf diese Weise erzielte gesteigerte Expression des Transkriptionsfaktors HIF-1 α , sowie dessen Dimerisierung mit HIF-1 β , verursacht die Bindung von HIF-1 an den VEGF-Promotor und dessen gesteigerte Synthese. Der Beitrag des von glatten Muskelzellen und Epithelzellen sezernierten VEGFs zum Gefäßumbau beruht zu allererst auf einer direkten proliferativen Wirkung auf Endothelzellen (Christou *et al.*, 1998; Hirose *et al.*, 2000). Dann spielt VEGF bei der Pathogenese von pulmonaler Hypertonie ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Rekrutierung von Entzündungszellen. VEGF bewirkt, dass das Endothel permeabel wird, indem sich Schlussleisten weiten (Bogatcheva *et al.*, 2002). Diese gestörte endotheliale Barrierefunktion fördert die Migration von Entzündungszellen sowie die Bildung eines subendothelialen und geweblichen Ödems, indem gelöste Stoffe und Blutplasma durch das einschichtige Endothel gelangen (McQuaid und Keenan, 1997). Dies ermöglicht nun proliferativen Mediatoren die tieferen Zellschichten der Gefäßwand zu erreichen und dort die Proliferation glatter Muskelzellen und Fibroblasten zu fördern (Mandegar *et al.*, 2004). Außerdem greift VEGF bewiesenermaßen bei pulmonaler Hypertonie und Neoplasien in den Entzündungsprozess ein, indem es die Expression des Chemokins CXCL12 reguliert. CXCL12 trägt zur Rekrutierung von Entzündungszellen und

Vorläuferzellen in beschädigte und ischämische Regionen bei (De Falco *et al.*, 2004; Grunewald *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006; Petit *et al.*, 2007). Hinweise für die Beteiligung des CXCL12 an der Pathogenese der pulmonalen Hypertonie liefert das gleichzeitige Auftreten von CXCL12 und seinem korrespondierenden Rezeptor CXCR4 in umgebauten, pulmonalen Gefäßen hypoxischer Ratten (Burke *et al.*, 2009). Außerdem ist bekannt, dass Hypoxie und CXCL12 eine erhöhte VCAM-1 und Integrin-Expression einleiten, von denen beide die Rekrutierung von Monozyten und Vorläuferzellen mitverantworten (Ulyanova *et al.*, 2005; Tong *et al.*, 2006; Yamashita *et al.*, 2008). Wird das chemotaktisch wirksame CXCL12 unter experimentellen Bedingungen blockiert, liegen Makrophagen, T-Zellen und Mastzellen in wesentlich geringerer Anzahl in den Gefäßwänden vor. Zudem nimmt der Anteil vollmuskularisierter pulmonaler Arterien ab und der nichtmuskularisierter Arterien zu (Savai *et al.*, 2012). Dies verdeutlicht den notwendigen Beitrag entzündungsfördernder Chemokine wie CXCL12 und die Beteiligung von Immunzellen am Krankheitsgeschehen der pulmonalen Hypertonie.

Auf diese Weise kann spekuliert werden, ob die bei Lungentumoren auftretende Hypoxie über eine Aktivierung von HIF-1 zu einer gesteigerten VEGF-Synthese und einer Rekrutierung von Immunzellen führt und somit einen erheblichen Beitrag zum vaskulären Remodeling leistet.

Ein anderer Mechanismus, über den Hypoxie zur Rekrutierung von Entzündungszellen führt, umfasst NAD(P)H-Oxidasen. Hypoxie verursacht nämlich ebenso eine Modulation der adventitialen Fibroblasten-Komposition und somit deren veränderte Produktion von Wachstumsfaktoren und extrazellulärer Matrix, durch die benachbarte glatte Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen beeinflusst werden (Stenmark *et al.*, 2002). Diese Fibroblasten vermögen jedoch auch unter Hypoxie eine große Palette an Chemokinen zu produzieren, die die Rekrutierung von Leukozyten in die Gefäßwände veranlassen. Dieser Prozess ist bislang noch nicht ganz geklärt, wird aber wahrscheinlich über NAD(P)H-Oxidasen reguliert (Capers *et al.*, 1997; Stenmark *et al.*, 2006).

Ein letztes Verfahren, wie Hypoxie zur Entstehung von pulmonaler Hypertonie beiträgt, betrifft den sogenannten Euler-Liljestrand-Reflex. Hypoxie bewirkt, als adaptiver Mechanismus der nur in der Lunge vorkommt, eine pulmonale Vasokonstriktion. Plötzlich auftretende Hypoxie bedingt die Verlagerung des Blutflusses weg von spärlich ventilierten Arealen der Lunge hin zu besser ventilierten Gebieten, indem, durch reflexartige Vasokonstriktion, die Oxygenierung des venösen Blutes maximiert wird (Euler und Liljestrand, 1946). Halten die hypoxischen Bedingungen länger an, führt dies jedoch zu einem Sauerstoffmangel in der Lunge, da die Vasokonstriktion in diesem Fall in großen Teilen der Lunge, wenn nicht in der gesamten Lunge, auftritt. Folglich stellt sich ein Anstieg des pulmonalen vaskulären Widerstands ein, der zu pulmonaler Hypertonie mit vaskulärem Remodeling führt und die hypoxischen Bedingungen noch verstärkt (Meyrick, 2001; Pietra *et al.*, 2004; Mooi und Grünberg, 2006; Tuder, 2009). Da in allen drei durchgeführten Mausmodellen eine ausgeprägte Hypoxämie nachgewiesen werden konnte, vermutlich durch Obstruktion der kleinen Atemwege und Behinderung der Lungenexpansion, ist es durchaus vorstellbar, dass der Euler-Liljestrand-Reflex auch bei Lungenkrebs in den hypoventilierten Lungenarealen zum Tragen kommt.

Neben einem Entzündungsgeschehen und Hypoxie verfügen die stetig wachsenden Tumoren über ein letztes Mittel, um auf das umliegende Gewebe einzuwirken: die Kompression. So konnte bereits anhand der Blutgasanalyse eine, durch das Tumorwachstum bedingte Hypoventilation nachgewiesen werden, wahrscheinlich durch einfache, physikalische Kompression der luftführenden Wege. Daher wäre es wenig verwunderlich, wenn dieser pressende Effekt auch auf die Blutgefäße abziele, zumal auf solche in der Tumorperipherie. Als Konsequenz würden die Scherkräfte in diesen komprimierten Gefäßen ansteigen. Es gilt als bewiesen, dass Scherkräfte pulmonale Hypertonie auslösen können, indem Endothelzellen dazu stimuliert werden, Kollagenablagerung zu fördern und die Proliferation glatter Muskelzellen zu unterstützen (Kasper, 2005). Folglich steigt der pulmonale vaskuläre Widerstand an, der zu einer Erhöhung des pulmonalen Drucks und der rechtsventrikulären Nachlast führt.

Auf diese Weise können neben den bereits beschriebenen Effekten von Tumorzellembolien, ebenso die bei der Entwicklung von Lungentumoren entstehende Hypoxie und nachfolgende Entzündung, sowie Gewebekompression die Kaskade der Gefäßumbauprozesse einleiten.

4.7 Klinische Bedeutung und Ausblick

Die durchgeführten Versuche liefern eindeutige Beweise für das Vorhandensein von pulmonaler Hypertonie sowohl bei benignen, wie auch bei malignen Lungentumorerkrankungen, indem sowohl das vaskuläre Remodeling, der Anstieg des rechtsventrikulären systolischen Drucks als auch das Rechtsherzversagen nachgewiesen wurde. Anhand der regelmäßigen echokardiographischen Untersuchungen, durch die die hämodynamische und die kardiale Funktion der Mäuse über die gesamte Versuchsdauer verfolgt werden konnten, wird verdeutlicht, dass es sich bei dem nachgewiesenen Lungenhochdruck um ein im finalen Stadium auftretendes Phänomen handelt. Da bei Lungenkrebspatienten bei Erstvorstellung, die meist erst in einem fortgeschrittenen Stadium erfolgt, 60-70 % der Patienten Dyspnoe aufweisen (Smith *et al.*, 2001; Henoch *et al.*, 2008; Reddy *et al.*, 2009), kann diese durchaus, neben der durch das stetige Lungentumorwachstum bedingten Hypoventilation, auch durch Lungenhochdruck bedingt sein.

Als Ursache für dieses späte Auftreten des pulmonalen Überdrucks und der kardialen Folgen muss das Fortschreiten der tumoralen Erkrankung genannt werden. So schätzen Stenmark *et al.*, dass 80 % der gesamten pulmonalvaskulären luminalen Fläche betroffen sein müssen, um einen Überdruck in der *Arteria pulmonalis* auszulösen (Stenmark *et al.*, 2009). Dies bewirkt, dass ein weit fortgeschrittenes Tumorleiden mit ausgedehntem Tumor-Areal vorliegen muss, um eine Erhöhung des pulmonalarteriellen Drucks zu induzieren. Dies wird auch ersichtlich aus der Tatsache, dass SP-C-c-raf-1-BxB-23-Mäuse mit dem größten Anteil des Tumor-Areals den höchsten rechtsventrikulären Druck und eine Rechtsherzhypertrophie aufwiesen.

Da in der Mehrzahl der Krebspatienten der Zeitpunkt, an dem respiratorische Symptome auftreten, der ist, an dem die primäre Krebserkrankung nur mehr selten heilbar ist und weitverbreitete Metastasen vorliegen (Mehrishi *et al.*, 2004), sollte sich die Therapie auf die Primärursache, die Lungentumoren, konzentrieren. Palliativ könnte aber eventuell die Behandlung der pulmonalen Hypertonie, beispielsweise durch adjuvante Therapie mit Sauerstoff, zu einer Verbesserung der Lebensqualität führen (Stenmark *et al.*, 2009). Neue Ansätze zur Behandlung von pulmonaler Hypertonie entstammen heute zudem oft der Krebstherapie und basieren u.a. auf antiproliferativen Effekten, wie beispielsweise Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitoren (Schermyly und Grimminger, 2008). Solchen Therapeutika, die in Zukunft sicherlich an Bedeutung in der Behandlung von pulmonaler Hypertonie gewinnen werden, dürfte daher zur Therapie der Kombination aus Lungentumoren und Lungenhochdruck durchaus Beachtung geschenkt werden.

Anhand der neu gewonnenen Erkenntnisse könnte vorgeschlagen werden, die durch Lungentumoren verursachte pulmonale Hypertonie in die Gruppen 3, 4 oder 5 der Klassifikation der pulmonalen Hypertonie einzuordnen (Siehe Tabelle 1.3).

Die Gruppe 4 beinhaltet nicht nur die Fälle von pulmonaler Hypertonie, die durch Thrombembolien ausgelöst wurden, sondern ebenfalls solche, verursacht durch initiiierende, nicht-thrombotische pulmonale Embolien mit Fremdkörpern, Parasiten, Knochenmark, Fettgewebe und Tumorzellen (Mandegar *et al.*, 2004; Stenmark *et al.*, 2009). Obwohl Tumorzellen im LLC1- und Kras^{LA2}-Lungentumormodell nicht auszuschließen sind, ist die Zuordnung zur Gruppe 4 trotzdem wenig angemessen, da, durch die Verwendung des gutartigen, nicht metastasierenden SP-C-c-raf-1-BxB-23-Modells, deutlich wird, dass das Auftreten von Tumorzellembolien nicht alleine für den Umbau der Gefäße verantwortlich gemacht werden kann.

Die Gruppe 3 umfasst Erkrankungen des Lungenparenchyms, die zur Zerstörung des Lungengefäßbetts und der Mikrozirkulation führen (z.B. Lungenemphysem, interstitielle oder zystische Fibrose), sowie Fälle mit, durch chronische Hypoxie ausgelöster Vasokonstriktion (z.B. bei Schlafapnoe oder Aufenthalt in großen Höhen) (Mandegar *et al.*, 2004). Die Gruppe 3 ist histologisch gekennzeichnet

durch muskularisierte Arteriolen, mediale Hypertrophie von Arterien, longitudinal orientierte, intimale, glatte Muskelzellen und eine leichte mediale Hypertrophie von Venen (Stenmark *et al.*, 2009). Dieses histologische Bild entspricht dem, welches in den murinen und humanen Lungentumorschnitten aufgefunden wurde, mit Zerstörung des Lungengefäßbetts durch die proliferierenden Tumorzellen. Zudem stellt Hypoxie, als Hauptmerkmal solider Tumoren und als Konsequenz der, durch Kompression der zuführenden Luftwege behinderten Ventilation, einen möglichen Auslöser des vaskulären Remodelings dar. Diese Kategorie berücksichtigt jedoch nicht den Druck auf die v.a. in der Tumorperipherie gelegenen Blutgefäße und den möglichen Beitrag intravasal vorkommender Tumorzellen.

Um diesen Umständen gerecht zu werden, könnte eine Zuordnung der pulmonalen Hypertonie bei Lungenneoplasien zur Gruppe 5 vorgeschlagen werden. Dabei handelt es sich um eine heterogene Gruppe von Störungen, die die Eigenschaften kongestiver Vaskulopathien, postthrombotischer Vaskulopathien, Kompressionen von Blutgefäßen oder Kombinationen zeigen (Mandegar *et al.*, 2004; Stenmark *et al.*, 2009). Ähnlich wie COPD-Patienten, welche offiziell in der Gruppe 5 geführt werden, tragen Tumoren multifaktoriell zur Entwicklung von pulmonalem Überdruck bei. Diese Faktoren betreffen möglicherweise die Bildung einer pulmonalen vaskulären Endarteritis durch Festsetzen zirkulierender Tumorzellen, Kompression luftführender Wege mit Hypoxämie, das Auftreten lokaler hypoxischer und entzündlicher Areale innerhalb des Tumors und Gefäßkompression von außen.

Unter welchen Bedingungen genau diese beschriebenen Mechanismen das nachgewiesene Remodeling bei Lungenkrebspatienten einleiten und wie Entzündungszellen dazu befähigt werden sich am Gefäßumbauprozess der Tumorgefäße zu beteiligen, bedarf weiterer Untersuchungen. Aus diesem Grund werden anschließend an die beschriebenen Versuche molekularbiologische Untersuchungen geplant. So sollen *in vitro* Co-Culture-Experimente zwischen Lymphozyten bzw. Makrophagen, malignen Lungentumorzellen und glatten Muskelzellen bzw. Endothelzellen zur weiteren Abklärung der Wechselwirkung zwischen diesen Zelltypen durchgeführt werden.

5 Zusammenfassung

60-70 % aller Lungenkrebspatienten weisen bei Erstvorstellung als eines der primären Symptome Dyspnoe auf. Dieser Anteil schweratmiger Patienten steigt bis auf 90 % kurz vor dem Tod. Unter Beachtung von Fallbeschreibungen, die das Auftreten von pulmonaler Hypertonie bei diversen malignen Organerkrankungen nach Tumorzelembolie dokumentieren, bestand das Ziel dieser Arbeit darin, die Beteiligung von pulmonaler Hypertonie an der bei Lungenkrebs nachzuweisenden Dyspnoe zu untersuchen.

Drei unterschiedliche Mausmodelle standen zur Verfügung: C57BL/6N-Mäuse, die eine intravenöse Injektion von einer Million Lewis-lung-carcinoma-1-Zellen in die laterale Schwanzvene erhielten, K-ras^{LA2} Knock-in-Mäuse und SP-C-c-raf-1-BxB-23 transgene Mäuse. Es erfolgten regelmäßige, echokardiographische Untersuchungen wie auch, zu Versuchsende, die hämodynamische Erfassung des rechtsventrikulären systolischen Drucks und des systemisch arteriellen Drucks. Die histologische Auswertung diente der Bestimmung der vaskulären Morphometrie im Tumor-Areal und im Nicht-Tumor-Areal, sowie der Messung des Gesamtkollagengehalts des rechten Ventrikels. Die histologische Evaluierung wurde an den entnommenen murinen Lungen und an humanen Donorlungen ausgeführt. Um zusätzlich den Beitrag von Entzündungszellen an der Pathogenese der pulmonalen Hypertonie zu untersuchen, wurden Makrophagen (CD68⁺), T-Lymphozyten (CD3⁺) und dendritische Zellen (CD209⁺) in den Gefäßwänden des humanen Lungentumorgewebes quantifiziert.

In allen murinen Lungentumormodellen veranschaulicht die Echokardiographie eine beeinträchtigte systolische, diastolische und globale rechtsventrikuläre Funktion ebenso wie eine Dilatation des rechten Ventrikels. In der hämodynamischen Messung der Lungentumormodelle wird stets ein erhöhter rechtsventrikulärer systolischer Druck erfasst. Murine und humane Lungentumorschnitte weisen vaskuläre Umbauprozesse im Tumor-Areal auf, die sowohl eine Zunahme der medialen Wandstärke wie auch eine Steigerung des

Muskularisierungsgrads betreffen. Die Bestimmung des Gesamtkollagens ermöglicht zudem den Nachweis einer rechtsventrikulären Fibrose. Schließlich kann ein gehäuftes Vorkommen von T-Lymphozyten und Makrophagen in pulmonalen Gefäßwänden des Tumor-Areals in humanen Lungenproben dokumentiert werden.

Somit liefert diese Studie klare Beweise für das Vorkommen von pulmonaler Hypertonie bei Lungenkrebspatienten, so wie auch in Lungenneoplasien ausbildenden Tiermodellen. Die durchgeführte echokardiographische Verlaufskontrolle ermöglicht die Schlussfolgerung, dass es sich bei der nachgewiesenen pulmonalen Hypertonie um ein im finalen Lungenkrebsstadium auftretendes Phänomen handelt. Der erhöhte Zellgehalt an T-Lymphozyten und Makrophagen in den pulmonalen Gefäßwänden bringt uns zu der Feststellung, dass diese genannten Immunzellen am vaskulären Remodeling der kleinen Gefäße im Tumor beteiligt sind.

6 Summary

Approximately 60–70 % of patients with lung cancer have dyspnea at presentation, and 90 % experience it just prior to death. Considering case reports describing the formation of pulmonary hypertension via pulmonary tumor microemboli from various cancer types, we analyzed the involvement of pulmonary hypertension in the development of dyspnea in lung cancer using different mouse models and human lung tumor samples.

Three murine lung cancer models have been used: C57BL/6N-mice that received an injection of Lewis-lung-carcinoma-1-cells (LLC1) via tail vein, K-ras^{LA2} knock-in-mice and SP-C-c-raf-1-BxB-23 transgene mice. They underwent echocardiographic analyses at different time points and hemodynamic measurements to assess the right ventricular systolic pressure and systemic arterial pressure. Histological evaluation was performed to determine the pulmonary vascular morphometry in the tumor-area as well as the total collagen of the right ventricle. Identical histological analyses have been done in human lung tumor samples. In addition, to understand the contribution of immune cells to the development of pulmonary hypertension in lung cancer setting, pulmonary vascular walls were analyzed in human lung tumor tissue and quantified for macrophages (CD68⁺), T-lymphocytes (CD3⁺) and dendritic cells (CD209⁺).

For each mouse model, echocardiography reveals an impaired systolic, diastolic and global function of the right ventricle, as well as a dilated right ventricle. Hemodynamics show an increased right ventricular systolic pressure. Murine and human lung tumor samples demonstrate vascular remodeling, affecting both wall thickness and the degree of muscularization in the tumor-area. The quantification of total collagen enables to prove a right ventricular fibrosis. Higher incidences of T-lymphocytes and macrophages in pulmonary vascular walls were demonstrated in the tumor-area of human lung section.

This study provides clear evidence for the existence of pulmonary hypertension in human as well as animal models affected by lung cancer. Repeated echocardiographic analyses show that the detected pulmonary hypertension represents an end-stage phenomenon. The increased content of T-lymphocytes and macrophages in the vascular walls leads us to the hypothesis that these cell types might be involved in the remodeling of small pulmonary vessels in tumors.

7 Literaturverzeichnis

- Abbondanzo SL, Klappenbach RS and Tsou E** (1986). Tumor cell embolism to pulmonary alveolar capillaries. Cause of sudden cor pulmonale. *Arch Pathol Lab Med* 110(12): 1197-1198.
- Aguayo F, Castillo A, Koriyama C, Higashi M, Itoh T, Capetillo M, Shuyama K, Corvalan A, Eizuru Y and Akiba S** (2007). Human papillomavirus-16 is integrated in lung carcinomas: a study in Chile. *Br J Cancer* 97(1): 85-91.
- Altekruse SF, Kosary CL, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Waldron W, Ruhl J, Howlander N, Tatalovich Z, Cho H, et al., Eds.** (2010). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2007. Bethesda, MD, National Cancer Institute.
- Ando H, Ootake Y and Asaka S** (1997). Subacute pulmonary hypertension due to pulmonary tumor microembolism as a clinical manifestation of occult gallbladder adenocarcinoma. *Jpn Circ J* 61(1): 82-86.
- ATCC** (2012). Product Information Sheet for ATCC® CRL-1642™ Cell Line Designation: LL/2 (LLC1), American Type Culture Collection.
- Avruch J, Zhang XF and Kyriakis JM** (1994). Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway. *Trends Biochem Sci* 19(7): 279-283.
- Avwioro G** (2011). Histochemical uses of haematoxylin - a review. *Journal of Pharmacy and Clinical Sciences* 1: 24-34.
- Axiotis CA and Jennings TA** (1988). Observations on bronchiolo-alveolar carcinomas with special emphasis on localized lesions. A clinicopathological, ultrastructural, and immunohistochemical study of 11 cases. *Am J Surg Pathol* 12(12): 918-931.
- Badano LP, Gingham C, Easaw J, Muraru D, Grillo MT, Lancellotti P, Pinamonti B, Coghlan G, Marra MP, Popescu BA, et al.** (2010). Right ventricle in pulmonary arterial hypertension: haemodynamics, structural changes, imaging, and proposal of a study protocol aimed to assess remodelling and treatment effects. *Eur J Echocardiogr* 11(1): 27-37.
- Badesch DB, Champion HC, Sanchez MA, Hoeper MM, Loyd JE, Manes A, McGoon M, Naeije R, Olschewski H, Oudiz RJ, et al.** (2009). Diagnosis and assessment of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 54(1): 55-66.
- Balabanian K, Foussat A, Dorfmueller P, Durand-Gasselin I, Capel F, Bouchet-Delbos L, Portier A, Marfaing-Koka A, Krzysiek R, Rimaniol AC, et al.** (2002). CX(3)C chemokine fractalkine in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 165(10): 1419-1425.
- Barst RJ** (1996). Diagnosis and treatment of pulmonary artery hypertension. *Curr Opin Pediatr* 8(5): 512-519.
- Bast RC, Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Holland JF and Frei E, Eds.** (2000). Holland-Frei Cancer Medicine, 5th edition. Ontario, BC Decker.
- Beer DG and Malkinson AM** (1985). Genetic influence on type 2 or Clara cell origin of pulmonary adenomas in urethan-treated mice. *J Natl Cancer Inst* 75(5): 963-969.
- Bennaceur K, Popa I, Portoukalian J, Berthier-Vergnes O and Peguet-Navarro J** (2006). Melanoma-derived gangliosides impair migratory and antigen-presenting function of human epidermal Langerhans cells and induce their apoptosis. *Int Immunol* 18(6): 879-886.
- Berridge MJ** (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361(6410): 315-325.
- Bertram JS and Janik P** (1980). Establishment of a cloned line of Lewis Lung Carcinoma cells adapted to cell culture. *Cancer Lett* 11(1): 63-73.
- Blasco RB, Francoz S, Santamaria D, Canamero M, Dubus P, Charron J, Baccarini M and Barbacid M** (2011). c-Raf, but not B-Raf, is essential for development of K-Ras oncogene-driven non-small cell lung carcinoma. *Cancer Cell* 19(5): 652-663.

- Blaustein MP** (1993). Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca^{2+} stores and cell responsiveness. *Am J Physiol* 264(6 Pt 1): 1367-1387.
- Blom JW, Doggen CJ, Osanto S and Rosendaal FR** (2005). Malignancies, prothrombotic mutations, and the risk of venous thrombosis. *JAMA* 293(6): 715-722.
- Böcker W, Denk H and Heitz PU, Eds.** (2004). Pathologie. München, Elsevier GmbH.
- Bogaard HJ, Abe K, Vonk Noordegraaf A and Voelkel NF** (2009). The right ventricle under pressure: cellular and molecular mechanisms of right-heart failure in pulmonary hypertension. *Chest* 135(3): 794-804.
- Bogatcheva NV, Garcia JG and Verin AD** (2002). Molecular mechanisms of thrombin-induced endothelial cell permeability. *Biochemistry (Mosc)* 67(1): 75-84.
- Bonnet S, Archer SL, Allalunis-Turner J, Haromy A, Beaulieu C, Thompson R, Lee CT, Lopaschuk GD, Puttagunta L, Harry G, et al.** (2007a). A mitochondria- K^+ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer Cell* 11(1): 37-51.
- Bonnet S, Michelakis ED, Porter CJ, Andrade-Navarro MA, Thebaud B, Haromy A, Harry G, Moudgil R, McMurtry MS, Weir EK, et al.** (2006). An abnormal mitochondrial-hypoxia inducible factor-1 α -Kv channel pathway disrupts oxygen sensing and triggers pulmonary arterial hypertension in fawn hooded rats: similarities to human pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 113(22): 2630-2641.
- Bonnet S, Rochefort G, Sutendra G, Archer SL, Haromy A, Webster L, Hashimoto K, Bonnet SN and Michelakis ED** (2007b). The nuclear factor of activated T cells in pulmonary arterial hypertension can be therapeutically targeted. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(27): 11418-11423.
- Bos JL** (1989). ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 49(17): 4682-4689.
- Bozaci EA, Taskin S, Gurkan O, Atasoy C, Ersoy ZG, Ereku S, Numanoglu N and Ortac F** (2005). Intracavitary cardiac metastasis and pulmonary tumor emboli of choriocarcinoma: the first case diagnosed and treated without surgical intervention. *Gynecol Oncol* 99(3): 753-756.
- Breasted JH** (1930). The Edwin Smith Surgical Papyrus. Chicago, University of Chicago Press.
- Brenner DR, Boffetta P, Duell EJ, Bickeboller H, Rosenberger A, McCormack V, Muscat JE, Yang P, Wichmann HE, Brueske-Hohlfeld I, et al.** (2012). Previous lung diseases and lung cancer risk: a pooled analysis from the international lung cancer consortium. *Am J Epidemiol* 176(7): 573-585.
- Brill IC and Robertson TD** (1937). Subacute cor pulmonale. *Arch Intern Med* 60: 1043-1057.
- Brinkmann B and Madea B, Eds.** (2003). Handbuch gerichtliche Medizin Band 1. Berlin, Springer-Verlag.
- Brisbane JU, Howell DA and Bonkowsky HL** (1980). Pulmonary hypertension as a presentation of hepatocarcinoma. Report of a case and brief review of the literature. *Am J Med* 68(3): 466-469.
- Brody JS and Spira A** (2006). State of the art. Chronic obstructive pulmonary disease, inflammation, and lung cancer. *Proc Am Thorac Soc* 3(6): 535-537.
- Brose MS, Volpe P, Feldman M, Kumar M, Rishi I, Gerrero R, Einhorn E, Herlyn M, Minna J, Nicholson A, et al.** (2002). BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res* 62(23): 6997-7000.
- Bruce-Gregorios JH** (2006). Histopathologic techniques, 2nd edition. Quezon City, Goodwill Trading CO.
- Bueno OF, De Windt LJ, Tymitz KM, Witt SA, Kimball TR, Klevitsky R, Hewett TE, Jones SP, Lefer DJ, Peng CF, et al.** (2000). The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *EMBO J* 19(23): 6341-6350.
- Burke DL, Frid MG, Kunrath CL, Karoor V, Anwar A, Wagner BD, Strassheim D and Stenmark KR** (2009). Sustained hypoxia promotes the development of a pulmonary artery-specific chronic inflammatory microenvironment. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297(2): L238-250.

- Capers Qt, Alexander RW, Lou P, De Leon H, Wilcox JN, Ishizaka N, Howard AB and Taylor WR** (1997). Monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic tissues of hypertensive rats. *Hypertension* 30(6): 1397-1402.
- Caslin AW, Heath D, Madden B, Yacoub M, Gosney JR and Smith P** (1990). The histopathology of 36 cases of plexogenic pulmonary arteriopathy. *Histopathology* 16(1): 9-19.
- Cekanova M, Majidy M, Masi T, Al-Wadei HA and Schuller HM** (2007). Overexpressed Raf-1 and phosphorylated cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate response element-binding protein are early markers for lung adenocarcinoma. *Cancer* 109(6): 1164-1173.
- Cella M, Sallusto F and Lanzavecchia A** (1997). Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 9(1): 10-16.
- Ceteci F, Ceteci S, Karreman C, Kramer BW, Asan E, Gotz R and Rapp UR** (2007). Disruption of tumor cell adhesion promotes angiogenic switch and progression to micrometastasis in RAF-driven murine lung cancer. *Cancer Cell* 12(2): 145-159.
- Ceteci F, Xu J, Ceteci S, Zanucco E, Thakur C and Rapp UR** (2011). Conditional expression of oncogenic C-RAF in mouse pulmonary epithelial cells reveals differential tumorigenesis and induction of autophagy leading to tumor regression. *Neoplasia* 13(11): 1005-1018.
- Chang CH, Jan ML, Fan KH, Wang HE, Tsai TH, Chen CF, Fu YK and Lee TW** (2006). Longitudinal evaluation of tumor metastasis by an FDG-microPet/microCT dual-imaging modality in a lung carcinoma-bearing mouse model. *Anticancer Res* 26(1A): 159-166.
- Chang SM, Lin CC, Hsiao SH, Lee CY, Yang SH, Lin SK and Huang WC** (2007). Pulmonary hypertension and left heart function: insights from tissue Doppler imaging and myocardial performance index. *Echocardiography* 24(4): 366-373.
- Chin KM, Kim NH and Rubin LJ** (2005). The right ventricle in pulmonary hypertension. *Coron Artery Dis* 16(1): 13-18.
- Christman BW, McPherson CD, Newman JH, King GA, Bernard GR, Groves BM and Loyd JE** (1992). An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 327(2): 70-75.
- Christou H, Yoshida A, Arthur V, Morita T and Kourembanas S** (1998). Increased vascular endothelial growth factor production in the lungs of rats with hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18(6): 768-776.
- Conejo-Garcia JR, Benencia F, Courreges MC, Kang E, Mohamed-Hadley A, Buckanovich RJ, Holtz DO, Jenkins A, Na H, Zhang L, et al.** (2004). Tumor-infiltrating dendritic cell precursors recruited by a beta-defensin contribute to vasculogenesis under the influence of Vegf-A. *Nat Med* 10(9): 950-958.
- Cool CD, Stewart JS, Werahera P, Miller GJ, Williams RL, Voelkel NF and Tuder RM** (1999). Three-dimensional reconstruction of pulmonary arteries in plexiform pulmonary hypertension using cell-specific markers. Evidence for a dynamic and heterogeneous process of pulmonary endothelial cell growth. *Am J Pathol* 155(2): 411-419.
- Cooray S** (2004). The pivotal role of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signal transduction in virus survival. *J Gen Virol* 85(Pt 5): 1065-1076.
- Corradi D, Mormandi F, Tanzi G, Ricci R, Bini P, Giuliotti S and Zompatori M** (2006). Fatal cor pulmonale caused by pulmonary tumor microembolism in a patient with occult gastric cancer. *Cardiovasc Pathol* 15(3): 157-160.
- Coussens LM and Werb Z** (2002). Inflammation and cancer. *Nature* 420(6917): 860-867.
- Crowther M, Brown NJ, Bishop ET and Lewis CE** (2001). Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wounds and malignant tumors. *J Leukoc Biol* 70(4): 478-490.
- D'Alonzo GE, Barst RJ, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, Fishman AP, Goldring RM, Groves BM, Kernis JT, et al.** (1991). Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Ann Intern Med* 115(5): 343-349.

- Dahal BK, Cornitescu T, Tretyn A, Pullamsetti SS, Kosanovic D, Dumitrascu R, Ghofrani HA, Weissmann N, Voswinckel R, Banat GA, et al.** (2010). Role of epidermal growth factor inhibition in experimental pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 181(2): 158-167.
- Daily OP** (1995). Chronic pulmonary embolism. General Thoracic Surgery. F. G. Pearson, D. J. Ginsberg, R. J. Hiebert and C. A. McKneally. Philadelphia, Churchill Livingstone: pp. 597-611.
- Daley E, Emson C, Guignabert C, de Waal Malefyt R, Louten J, Kurup VP, Hogaboam C, Taraseviciene-Stewart L, Voelkel NF, Rabinovitch M, et al.** (2008). Pulmonary arterial remodeling induced by a Th2 immune response. *J Exp Med* 205(2): 361-372.
- Dartevelle P, Fadel E, Mussot S, Chapelier A, Herve P, de Perrot M, Cerrina J, Ladurie FL, Lehouerou D, Humbert M, et al.** (2004). Chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 23(4): 637-648.
- Dasari V, Gallup M, Lemjabbar H, Maltseva I and McNamara N** (2006). Epithelial-mesenchymal transition in lung cancer: is tobacco the "smoking gun"? *Am J Respir Cell Mol Biol* 35(1): 3-9.
- Daum G, Eisenmann-Tappe I, Fries HW, Troppmair J and Rapp UR** (1994). The ins and outs of Raf kinases. *Trends Biochem Sci* 19(11): 474-480.
- De Falco E, Porcelli D, Torella AR, Straino S, Iachininoto MG, Orlandi A, Truffa S, Biglioli P, Napolitano M, Capogrossi MC, et al.** (2004). SDF-1 involvement in endothelial phenotype and ischemia-induced recruitment of bone marrow progenitor cells. *Blood* 104(12): 3472-3482.
- De Wever O and Mareel M** (2003). Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol* 200(4): 429-447.
- Denoix P** (1946). Enquete permanente dans les centres anticancereux. *Bull Inst Natl Hyg* 1: 12-17.
- DeVita VT, Hellman SH and Rosenberg SA, Eds.** (1997). Cancer: principles and practice of oncology. 5th ed. Philadelphia, Lippincott-Raven.
- Dhodapkar MV, Steinman RM, Krasovsky J, Munz C and Bhardwaj N** (2001). Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med* 193(2): 233-238.
- Dietel M, Suttorp N and Zeitz M, Eds.** (2005). Harrisons Innere Medizin 16. Auflage. Berlin, ABW Wissenschaftsverlag GmbH.
- Dipp M, Nye PCG and Evans A** (2001). The vasoconstrictor released by hypoxia into the rat pulmonary circulation acts through a rho-associated kinase pathway and is removed during alveolar normoxia. *J Physiol*: 231-296.
- Doll R** (1955). Mortality from lung cancer in asbestos workers. *Br J Ind Med* 12(2): 81-86.
- Dvorak HF** (1987). Thrombosis and cancer. *Hum Pathol* 18(3): 275-284.
- Ebel K** (2012). The Quantification of Tumor Stromal Cells in Lung Cancer. Medizinische Klinik IV/V des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH. Gießen, Justus-Liebig-Universität Gießen. Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin.
- Edwards JP, Zhang X, Frauwirth KA and Mosser DM** (2006). Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J Leukoc Biol* 80(6): 1298-1307.
- Elliott CG, Barst RJ, Seeger W, Porres-Aguilar M, Brown LM, Zamanian RT and Rubin LJ** (2010). Worldwide physician education and training in pulmonary hypertension: pulmonary vascular disease: the global perspective. *Chest* 137(6 Suppl): 85-94.
- Emminger H, Ed.** (2005). Physikum EXAKT: Das gesamte Prüfungswissen für die 1. ÄP. Stuttgart, Thieme.
- Erbar P** (2000). Onkologie CompactLehrbuch. Pathophysiologie, Klinik und Therapie maligner Tumoren. Stuttgart, Schattauer Verlagsgesellschaft mbH.
- Euler UV and Liljestrand G** (1946). Observations on the pulmonary arterial pressure in the cat. *Acta Physiol Scand*: 12:301-320.

- Fadel E, Mazmanian GM, Baudet B, Detruit H, Verhoye JP, Cron J, Fattal S, Darteville P and Herve P** (2000). Endothelial nitric oxide synthase function in pig lung after chronic pulmonary artery obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* 162(4 Pt 1): 1429-1434.
- Faller DV** (1999). Endothelial cell responses to hypoxic stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26(1): 74-84.
- Fanta CH and Compton CC** (1980). Microscopic tumour emboli to the lungs: a hidden cause of dyspnoea and pulmonary hypertension. *Thorax* 35(10): 794-795.
- Fantozzi I, Zhang S, Platoshyn O, Remillard CV, Cowling RT and Yuan JX** (2003). Hypoxia increases AP-1 binding activity by enhancing capacitative Ca^{2+} entry in human pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285(6): L1233-1245.
- Fedorov LM, Tyrsin OY, Papadopoulos T, Camarero G, Gotz R and Rapp UR** (2002). Bcl-2 determines susceptibility to induction of lung cancer by oncogenic CRaf. *Cancer Res* 62(21): 6297-6303.
- Fischer C, Jonckx B, Mazzone M, Zacchigna S, Loges S, Pattarini L, Chorianopoulos E, Liesenborghs L, Koch M, De Mol M, et al.** (2007). Anti-PlGF inhibits growth of VEGF(R)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy vessels. *Cell* 131(3): 463-475.
- Folkman J** (1990). What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 82(1): 4-6.
- Foti P, Malanga AL and Rosen JM** (1992). Diffuse pulmonary tumor microemboli from adenocarcinoma of the colon. *South Med J* 85(10): 1027-1029.
- Freeman MR, Schneck FX, Gagnon ML, Corless C, Soker S, Niknejad K, Peoples GE and Klagsbrun M** (1995). Peripheral blood T lymphocytes and lymphocytes infiltrating human cancers express vascular endothelial growth factor: a potential role for T cells in angiogenesis. *Cancer Res* 55(18): 4140-4145.
- Frid MG, Brunetti JA, Burke DL, Carpenter TC, Davie NJ, Reeves JT, Roedersheimer MT, van Rooijen N and Stenmark KR** (2006). Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling requires recruitment of circulating mesenchymal precursors of a monocyte/macrophage lineage. *Am J Pathol* 168(2): 659-669.
- Gabrilovich DI, Ishida T, Nadaf S, Ohm JE and Carbone DP** (1999). Antibodies to vascular endothelial growth factor enhance the efficacy of cancer immunotherapy by improving endogenous dendritic cell function. *Clin Cancer Res* 5(10): 2963-2970.
- Galie N, Hoeper MM, Humbert M, Torbicki A, Vachiery JL, Barbera JA, Beghetti M, Corris P, Gaine S, Gibbs JS, et al.** (2009a). Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS), endorsed by the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Heart J* 30(20): 2493-2537.
- Galie N, Manes A, Negro L, Palazzini M, Bacchi-Reggiani ML and Branzi A** (2009b). A meta-analysis of randomized controlled trials in pulmonary arterial hypertension. *Eur Heart J* 30(4): 394-403.
- Galie N, Palazzini M and Manes A** (2010). Pulmonary hypertension and pulmonary arterial hypertension: a clarification is needed. *Eur Respir J* 36(5): 986-990.
- Galie N, Torbicki A, Barst R, Darteville P, Haworth S, Higenbottam T, Olschewski H, Peacock A, Pietra G, Rubin LJ, et al.** (2004). Guidelines on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension. The Task Force on Diagnosis and Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 25(24): 2243-2278.
- Gan CT, Lankhaar JW, Marcus JT, Westerhof N, Marques KM, Bronzwaer JG, Boonstra A, Postmus PE and Vonk-Noordegraaf A** (2006). Impaired left ventricular filling due to right-to-left ventricular interaction in patients with pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290(4): H1528-1533.
- Gautier M, Antier D, Bonnet P, Le Net JL, Hanton G and Eder V** (2007). Continuous inhalation of carbon monoxide induces right ventricle ischemia and dysfunction in rats with hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293(2): H1046-1052.
- Gelfand ML and Tesler MA** (1962). Subacute cor pulmonale. Report of four cases. *Am J Cardiol* 10: 38-45.

- Geraci MW, Gao B, Shepherd DC, Moore MD, Westcott JY, Fagan KA, Alger LA, Tudor RM and Voelkel NF** (1999). Pulmonary prostacyclin synthase overexpression in transgenic mice protects against development of hypoxic pulmonary hypertension. *J Clin Invest* 103(11): 1509-1515.
- Gerok W, Huber C, Meinertz T and Zeidler H, Eds.** (2007). Die Innere Medizin: Referenzwerk für den Facharzt. Stuttgart, Schattauer Verlagsgesellschaft mbH.
- Gheit T, Muñoz JP, Levican J, González C, Ampuero S, Parra B, Gaggero A, Corvalán AH, Meneses M, Tommasino M, et al.** (2012). Merkel cell polyomavirus in non-small cell lung carcinomas from Chile. *Exp Mol Pathol* 93(1): 162-166.
- Ghio S, Klersy C, Magrini G, D'Armini AM, Scelsi L, Raineri C, Pasotti M, Serio A, Campana C and Viganò M** (2010). Prognostic relevance of the echocardiographic assessment of right ventricular function in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Int J Cardiol* 140(3): 272-278.
- Giaid A and Saleh D** (1995). Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 333(4): 214-221.
- Gillespie MN, Goldblum SE, Cohen DA and McClain CJ** (1988). Interleukin 1 bioactivity in the lungs of rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Proc Soc Exp Biol Med* 187(1): 26-32.
- Glasser SW, Korfhagen TR, Wert SE, Bruno MD, McWilliams KM, Vorbroker DK and Whitsett JA** (1991). Genetic element from human surfactant protein SP-C gene confers bronchiolar-alveolar cell specificity in transgenic mice. *Am J Physiol* 261(4 Pt 1): L349-356.
- Gonzalez-Vitale JC and Garcia-Bunuel R** (1976). Pulmonary tumor emboli and cor pulmonale in primary carcinoma of the lung. *Cancer* 38(5): 2105-2110.
- Graham JP, Rotman HH and Weg JG** (1976). Tumor emboli presenting as pulmonary hypertension. A diagnostic dilemma. *Chest* 69(2): 229-230.
- Grapsa I, Pavlopoulos H, Dawson D, Gibbs JS and Nihoyannopoulos P** (2007). Retrospective study of pulmonary hypertensive patients: is right ventricular myocardial performance index a vital prognostic factor? *Hellenic J Cardiol* 48(3): 152-160.
- Gross ME** (2001). Tranquilizers, α 2-adrenergic agonists, and related agents. Veterinary Pharmacology and Therapeutics. H. R. Adams. Ames (USA), Iowa State University Press: 299-342.
- Grunewald M, Avraham I, Dor Y, Bachar-Lustig E, Itin A, Jung S, Chimenti S, Landsman L, Abramovitch R and Keshet E** (2006). VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell* 124(1): 175-189.
- Hachulla E, Gressin V, Guillevin L, Carpentier P, Diot E, Sibilia J, Kahan A, Cabane J, Frances C, Launay D, et al.** (2005). Early detection of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: a French nationwide prospective multicenter study. *Arthritis Rheum* 52(12): 3792-3800.
- Hadi AM, Mouchaers KT, Schalij I, Grunberg K, Meijer GA, Vonk-Noordegraaf A, van der Laarse WJ and Belien JA** (2010). Rapid quantification of myocardial fibrosis: A new macro-based automated analysis. *Anal Cell Pathol (Amst)* 33(5): 257-269.
- Hajdu SI** (2011). A note from history: landmarks in history of cancer, part 1. *Cancer* 117 (5): 1097-1102.
- Hall S, Brogan P, Haworth SG and Klein N** (2009). Contribution of inflammation to the pathology of idiopathic pulmonary arterial hypertension in children. *Thorax* 64(9): 778-783.
- Handoko ML, de Man FS, Allaart CP, Paulus WJ, Westerhof N and Vonk-Noordegraaf A** (2010). Perspectives on novel therapeutic strategies for right heart failure in pulmonary arterial hypertension: lessons from the left heart. *Eur Respir Rev* 19(115): 72-82.
- Hardingham GE, Chawla S, Johnson CM and Bading H** (1997). Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. *Nature* 385(6613): 260-265.
- He XW, Tang YH, Luo ZQ, Gong LD and Cheng TO** (1989). Subacute cor pulmonale due to tumor embolization to the lungs. *Angiology* 40(1): 11-17.

- Heath D and Mackinnon J** (1964). Pulmonary Hypertension Due to Myxoma of the Right Atrium; with Special Reference to the Behavior of Emboli of Myxoma in the Lung. *Am Heart J* 68: 227-235.
- Henneke I, Greschus S, Savai R, Korfei M, Markart P, Mahavadi P, Schermuly RT, Wygrecka M, Sturzebecher J, Seeger W, et al.** (2010). Inhibition of urokinase activity reduces primary tumor growth and metastasis formation in a murine lung carcinoma model. *Am J Respir Crit Care Med* 181(6): 611-619.
- Henoch I, Bergman B, Gustafsson M, Gaston-Johansson F and Danielson E** (2008). Dyspnea experience in patients with lung cancer in palliative care. *Eur J Oncol Nurs* 12(2): 86-96.
- Hibbert M and Braude S** (1997). Tumour microembolism presenting as "primary pulmonary hypertension". *Thorax* 52(11): 1016-1017.
- Hindley A and Kolch W** (2002). Extracellular signal regulated kinase (ERK)/mitogen activated protein kinase (MAPK)-independent functions of Raf kinases. *J Cell Sci* 115(Pt 8): 1575-1581.
- Hirose S, Hosoda Y, Furuya S, Otsuki T and Ikeda E** (2000). Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors correlates closely with formation of the plexiform lesion in human pulmonary hypertension. *Pathol Int* 50(6): 472-479.
- Hoit BD, Dalton ND, Erzurum SC, Laskowski D, Strohl KP and Beall CM** (2005). Nitric oxide and cardiopulmonary hemodynamics in Tibetan highlanders. *J Appl Physiol* 99(5): 1796-1801.
- Hong WK, Bast RC, Hait WN, Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Holland JF and Frei E, Eds.** (2010). *Holland-Frei Cancer Medicine*, 8th edition. Shelton, People's Medical Publishing House, USA.
- Howard LS** (2011). Prognostic factors in pulmonary arterial hypertension: assessing the course of the disease. *Eur Respir Rev* 20(122): 236-242.
- Howlader N, Noone A, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Waldron W, Altekruse SF, Kosary CL, Ruhl J, Tatalovich Z, et al., Eds.** (2011). *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2008*. Bethesda, MD, National Cancer Institute.
- Hsiao SH, Lin SK, Wang WC, Yang SH, Gin PL and Liu CP** (2006a). Severe tricuspid regurgitation shows significant impact in the relationship among peak systolic tricuspid annular velocity, tricuspid annular plane systolic excursion, and right ventricular ejection fraction. *J Am Soc Echocardiogr* 19(7): 902-910.
- Hsiao SH, Yang SH, Wang WC, Lee CY, Lin SK and Liu CP** (2006b). Usefulness of regional myocardial performance index to diagnose pulmonary embolism in patients with echocardiographic signs of pulmonary hypertension. *Am J Cardiol* 98(12): 1652-1655.
- Huang Y, Snuderl M and Jain RK** (2011). Polarization of tumor-associated macrophages: a novel strategy for vascular normalization and antitumor immunity. *Cancer Cell* 19(1): 1-2.
- Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, Christman BW, Weir EK, Eickelberg O, Voelkel NF, et al.** (2004). Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 43(12 Suppl S): 13S-24S.
- Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, Bertocchi M, Habib G, Gressin V, Yaici A, Weitzenblum E, Cordier JF, Chabot F, et al.** (2006). Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry. *Am J Respir Crit Care Med* 173(9): 1023-1030.
- Hursting SD, Slaga TJ, Fischer SM, DiGiovanni J and Phang JM** (1999). Mechanism-based cancer prevention approaches: targets, examples, and the use of transgenic mice. *J Natl Cancer Inst* 91(3): 215-225.
- Imamura S, Kusunoki Y, Takifuji N, Kudo S, Matsui K, Masuda N, Takada M, Negoro S, Ryu S and Fukuoka M** (1994). Photodynamic therapy and/or external beam radiation therapy for roentgenologically occult lung cancer. *Cancer* 73(6): 1608-1614.
- Irwin RS and Rippe JM, Eds.** (2007). *Irwin and Rippe's Intensive Care Medicine*. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.
- Jain S, Ventura H and deBoisblanc B** (2007). Pathophysiology of pulmonary arterial hypertension. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth* 11(2): 104-109.

- Janssen KP, Abal M, El Marjou F, Louvard D and Robine S** (2005). Mouse models of K-ras-initiated carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1756(2): 145-154.
- Jauch K-W, Mutschler W, Hoffmann JN and Kanz K-G, Eds.** (2013). Chirurgie Basisweiterbildung: In 100 Schritten durch den Common Trunk, 2. Auflage. Berlin, Springer-Verlag.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E and Forman D** (2011). Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin* 61(2): 69-90.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T and Thun MJ** (2008a). Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 58(2): 71-96.
- Jemal A, Thun MJ and Ries LA** (2008b). Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2005, featuring trends in lung cancer, tobacco use, and tobacco control. *J Natl Cancer Inst.* 100(23): 1672-1694.
- Jimenez C, Hernandez C, Pimentel B and Carrera AC** (2002). The p85 regulatory subunit controls sequential activation of phosphoinositide 3-kinase by Tyr kinases and Ras. *J Biol Chem* 277(44): 41556-41562.
- Joh J, Jenson AB, Moore GD, Rezazadeh A, Slone SP, Ghim SJ and Kloecker GH** (2010). Human papillomavirus (HPV) and Merkel cell polyomavirus (MCPyV) in non small cell lung cancer. *Exp Mol Pathol* 89(3): 222-226.
- Johnson L, Mercer K, Greenbaum D, Bronson RT, Crowley D, Tuveson DA and Jacks T** (2001). Somatic activation of the K-ras oncogene causes early onset lung cancer in mice. *Nature* 410(6832): 1111-1116.
- Jurna I** (1992). Analgetika, Schmerzbekämpfung. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. W. Forth, D. Henschler, W. Rummel and K. Starke. Mannheim, BI Wissenschaftsverlag.
- Kalluri R and Zeisberg M** (2006). Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 6(5): 392-401.
- Kammertoens T, Schuler T and Blankenstein T** (2005). Immunotherapy: target the stroma to hit the tumor. *Trends Mol Med* 11(5): 225-231.
- Kane RD, Hawkins HK, Miller JA and Noce PS** (1975). Microscopic pulmonary tumor emboli associated with dyspnea. *Cancer* 36(4): 1473-1482.
- Kasper M** (2005). Phenotypic characterization of pulmonary arteries in normal and diseased lung. *Chest* 128(6 Suppl): 547-552.
- Kauffmann G, Moser E and Sauer R, Eds.** (1998). Grundlagen der Radiagnostik, Radiotherapie und Nuklearmedizin. München Wien Baltimore, Urban&Schwarzenberg.
- Kerkhoff E, Fedorov LM, Siefken R, Walter AO, Papadopoulos T and Rapp UR** (2000). Lung-targeted expression of the c-Raf-1 kinase in transgenic mice exposes a novel oncogenic character of the wild-type protein. *Cell Growth Differ* 11(4): 185-190.
- Khan R and Sheppard R** (2006). Fibrosis in heart disease: understanding the role of transforming growth factor-beta in cardiomyopathy, valvular disease and arrhythmia. *Immunology* 118(1): 10-24.
- Khosravi-Far R, Campbell S, Rossman KL and Der CJ** (1998). Increasing complexity of Ras signal transduction: involvement of Rho family proteins. *Adv Cancer Res* 72: 57-107.
- Khosravi-Far R and Der CJ** (1994). The Ras signal transduction pathway. *Cancer Metastasis Rev* 13(1): 67-89.
- King MB and Harmon KR** (1994). Unusual forms of pulmonary embolism. *Clin Chest Med* 15(3): 561-580.
- Knighton DR, Hunt TK, Scheuenstuhl H, Halliday BJ, Werb Z and Banda MJ** (1983). Oxygen tension regulates the expression of angiogenesis factor by macrophages. *Science* 221(4617): 1283-1285.
- Konduri S, Khan Q and Stites S** (2007). Pulmonary hypertension caused by metastatic breast cancer and its response to antihormone therapy and chemotherapy. *Breast J* 13(5): 506-508.

- Kontaridis MI, Yang W, Bence KK, Cullen D, Wang B, Bodyak N, Ke Q, Hinek A, Kang PM, Liao R, et al.** (2008). Deletion of Ptpn11 (Shp2) in cardiomyocytes causes dilated cardiomyopathy via effects on the extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase and RhoA signaling pathways. *Circulation* 117(11): 1423-1435.
- Kovacs G, Berghold A, Scheidl S and Olschewski H** (2009). Pulmonary arterial pressure during rest and exercise in healthy subjects: a systematic review. *Eur Respir J* 34(4): 888-894.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N and Mitchell RN** (2007). Robbins Basic Pathology, 8th edition. Philadelphia, Saunders Elsevier.
- Kuraki T, Kobayashi H, Nagata N and Kawai T** (1997). [Pulmonary tumor embolism caused by asymptomatic gastric cancer]. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi* 35(6): 641-644.
- Kvale PA** (1991). The cancer patient with dyspnea: unusual cause? *Mayo Clin Proc* 66(2): 215-218.
- LaDue JS** (1968). Clinical features. Lung Cancer, a Study of Five Thousand Memorial Hospital Cases. W. L. Watson. St. Louis, C. V. Mosby Co.: pp. 139-150.
- Lang M, Kojonazarov B, Tian X, Kalymbetov A, Weissmann N, Grimminger F, Kretschmer A, Stasch JP, Seeger W, Ghofrani HA, et al.** (2012). The soluble guanylate cyclase stimulator riociguat ameliorates pulmonary hypertension induced by hypoxia and SU5416 in rats. *PLoS One* 7(8): e43433.
- Larsen R** (1999). Anästhesie. München, Urban und Schwarzenberg.
- Levy M, Maurey C, Celermajer DS, Vouhe PR, Danel C, Bonnet D and Israel-Biet D** (2007). Impaired apoptosis of pulmonary endothelial cells is associated with intimal proliferation and irreversibility of pulmonary hypertension in congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol* 49(7): 803-810.
- Li H, Fan X and Houghton J** (2007). Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. *J Cell Biochem* 101(4): 805-815.
- Liotta LA and Kohn EC** (2001). The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 411(6835): 375-379.
- Lopez-Candales A, Rajagopalan N, Saxena N, Gulyasy B, Edelman K and Bazaz R** (2006). Right ventricular systolic function is not the sole determinant of tricuspid annular motion. *Am J Cardiol* 98(7): 973-977.
- Löscher W, Ungemach FR and Kroker R, Eds.** (2006). Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren. Stuttgart, Parey.
- Lourenco AP, Roncon-Albuquerque R, Jr., Bras-Silva C, Faria B, Wieland J, Henriques-Coelho T, Correia-Pinto J and Leite-Moreira AF** (2006). Myocardial dysfunction and neurohumoral activation without remodeling in left ventricle of monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291(4): H1587-1594.
- Lüllmann H, Mohr K and Hein L** (2010). Pharmakologie und Toxikologie: Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen. Stuttgart, Thieme.
- Ma J, Liu L, Che G, Yu N, Dai F and You Z** (2010). The M1 form of tumor-associated macrophages in non-small cell lung cancer is positively associated with survival time. *BMC Cancer* 10: 112.
- Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh CS, Culpepper JA, Wysocka M, Trinchieri G, Murphy KM and O'Garra A** (1995). Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol* 154(10): 5071-5079.
- MacLean MR, Sweeney G, Baird M, McCulloch KM, Houslay M and Morecroft I** (1996). 5-Hydroxytryptamine receptors mediating vasoconstriction in pulmonary arteries from control and pulmonary hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 119(5): 917-930.
- Malani AK, Gupta C, Kutty AV and Betlej T** (2007). Pulmonary tumor thrombotic microangiopathy from metastatic gallbladder carcinoma: an unusual cause of severe pulmonary hypertension. *Dig Dis Sci* 52(2): 555-557.

- Mandegar M, Fung YC, Huang W, Remillard CV, Rubin LJ and Yuan JX** (2004). Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling: role in the development of pulmonary hypertension. *Microvasc Res* 68(2): 75-103.
- Mantovani A and Sica A** (2010). Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr Opin Immunol* 22(2): 231-237.
- Marcus JT, Gan CT, Zwanenburg JJ, Boonstra A, Allaart CP, Gotte MJ and Vonk-Noordegraaf A** (2008). Interventricular mechanical asynchrony in pulmonary arterial hypertension: left-to-right delay in peak shortening is related to right ventricular overload and left ventricular underfilling. *J Am Coll Cardiol* 51(7): 750-757.
- Mauritz GJ, Marcus JT, Westerhof N, Postmus PE and Vonk-Noordegraaf A** (2011). Prolonged right ventricular post-systolic isovolumic period in pulmonary arterial hypertension is not a reflection of diastolic dysfunction. *Heart* 97(6): 473-478.
- Mayo JG** (1972). Biologic characterization of the subcutaneously implanted Lewis lung tumor. *Cancer Chemother Rep* 23(1): 325-330.
- McCormick F** (1999). Signalling networks that cause cancer. *Trends Biochem Sci* 24(12): M53-M56.
- McGavin MD and Zachary JF** (2009). Pathologie der Haustiere. München, Elsevier GmbH.
- McQuaid KE and Keenan AK** (1997). Endothelial barrier dysfunction and oxidative stress: roles for nitric oxide? *Exp Physiol* 82(2): 369-376.
- Medoff BD, Okamoto Y, Leyton P, Weng M, Sandall BP, Raher MJ, Kihara S, Bloch KD, Libby P and Luster AD** (2009). Adiponectin deficiency increases allergic airway inflammation and pulmonary vascular remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 41(4): 397-406.
- Mehrishi S, Awan A, Mehrishi A and Fein A** (2004). Pulmonary Tumor Microembolism. *Hosp Physician* 40(1): 23-30.
- Meyrick B** (2001). The pathology of pulmonary artery hypertension. *Clin Chest Med* 22(3): 393-404, vii.
- Meyrick B, Gamble W and Reid L** (1980). Development of Crotalaria pulmonary hypertension: hemodynamic and structural study. *Am J Physiol* 239(5): H692-702.
- Mikula M, Schreiber M, Husak Z, Kucerova L, Ruth J, Wieser R, Zatloukal K, Beug H, Wagner EF and Baccarini M** (2001). Embryonic lethality and fetal liver apoptosis in mice lacking the c-raf-1 gene. *EMBO J* 20(8): 1952-1962.
- Miller D, Farah MG, Liner A, Fox K, Schluchter M and Hoit BD** (2004). The relation between quantitative right ventricular ejection fraction and indices of tricuspid annular motion and myocardial performance. *J Am Soc Echocardiogr* 17(5): 443-447.
- Mitchell S, Ota A, Foster W, Zhang B, Fang Z, Patel S, Nelson SF, Horvath S and Wang Y** (2006). Distinct gene expression profiles in adult mouse heart following targeted MAP kinase activation. *Physiol Genomics* 25(1): 50-59.
- Miyata M, Ito M, Sasajima T, Ohira H and Kasukawa R** (2001). Effect of a serotonin receptor antagonist on interleukin-6-induced pulmonary hypertension in rats. *Chest* 119(2): 554-561.
- Mooi WJ and Grünberg K** (2006). Histopathology of pulmonary hypertensive diseases. *Current Diagnostic Pathology* 12(6): 429-440.
- Morrell NW, Adnot S, Archer SL, Dupuis J, Jones PL, MacLean MR, McMurtry IF, Stenmark KR, Thistlethwaite PA, Weissmann N, et al.** (2009). Cellular and molecular basis of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 54(1 Suppl): S20-31.
- Moser KM, Auger WR and Fedullo PF** (1990). Chronic major-vessel thromboembolic pulmonary hypertension. *Circulation* 81(6): 1735-1743.
- Moser KM, Auger WR, Fedullo PF and Jamieson SW** (1992). Chronic thromboembolic pulmonary hypertension: clinical picture and surgical treatment. *Eur Respir J* 5(3): 334-342.

- Moser KM, Daily PO, Peterson K, Dembitsky W, Vapnek JM, Shure D, Utley J and Archibald C** (1987). Thromboendarterectomy for chronic, major-vessel thromboembolic pulmonary hypertension. Immediate and long-term results in 42 patients. *Ann Intern Med* 107(4): 560-565.
- Mosser DM and Edwards JP** (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8(12): 958-969.
- Mueller MM and Fusenig NE** (2004). Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer* 4(11): 839-849.
- Mulisch M and Welsch U, Eds.** (2010). Romeis - Mikroskopische Technik, 18. Edition. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- Naoki K, Chen TH, Richards WG, Sugarbaker DJ and Meyerson M** (2002). Missense mutations of the BRAF gene in human lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 62(23): 7001-7003.
- Nelson RW and Couto G, Eds.** (2006). Innere Medizin der Kleintiere, 1. Auflage. München, Elsevier GmbH.
- Nesbit M, Schaidler H, Miller TH and Herlyn M** (2001). Low-level monocyte chemoattractant protein-1 stimulation of monocytes leads to tumor formation in nontumorigenic melanoma cells. *J Immunol* 166(11): 6483-6490.
- Nguewa PA, Calvo A, Pullamsetti SS, Banat GA, Grimminger F and Savai R** (2011). Tyrosine kinase inhibitors with antiangiogenic properties for the treatment of non-small cell lung cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 20(1): 61-74.
- Nicolls MR, Taraseviciene-Stewart L, Rai PR, Badesch DB and Voelkel NF** (2005). Autoimmunity and pulmonary hypertension: a perspective. *Eur Respir J* 26(6): 1110-1118.
- Noble S and Pasi J** (2010). Epidemiology and pathophysiology of cancer-associated thrombosis. *Br J Cancer* 102(Suppl 1): 2-9.
- Ohmura Y, Yoshikawa K, Saga S, Ueda R, Kazaoka Y and Yamada S** (2008). Combinations of tumor-specific CD8+ CTLs and anti-CD25 mAb provide improved immunotherapy. *Oncol Rep* 19(5): 1265-1270.
- Onuigbo WI** (1967). The carriage of cancer cells by the thoracic duct. *Br J Cancer* 21(3): 496-500.
- Opal SM, Kessler CM, Roemisch J and Knaub S** (2002). Antithrombin, heparin, and heparan sulfate. *Crit Care Med* 30(5 Suppl): S325-331.
- Ott S and Geiser T** (2012). [Epidemiology of lung tumors]. *Ther Umsch* 69(7): 381-388.
- Paget S** (1889). The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* 1: 571-573.
- Palanisamy N, Ateeq B, Kalyana-Sundaram S, Pflueger D, Ramnarayanan K, Shankar S, Han B, Cao Q, Cao X, Suleman K, et al.** (2010). Rearrangements of the RAF kinase pathway in prostate cancer, gastric cancer and melanoma. *Nat Med* 16(7): 793-798.
- Pandit B, Sarkozy A, Pennacchio LA, Carta C, Oishi K, Martinelli S, Pogna EA, Schackwitz W, Ustaszewska A, Landstrom A, et al.** (2007). Gain-of-function RAF1 mutations cause Noonan and LEOPARD syndromes with hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet* 39(8): 1007-1012.
- Peacock AJ, Murphy NF, McMurray JJ, Caballero L and Stewart S** (2007). An epidemiological study of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 30(1): 104-109.
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K and Cobb MH** (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22(2): 153-183.
- Perl AK, Tichelaar JW and Whitsett JA** (2002). Conditional gene expression in the respiratory epithelium of the mouse. *Transgenic Res* 11(1): 21-29.
- Perros F, Dorfmüller P, Souza R, Durand-Gasselin I, Mussot S, Mazmanian M, Herve P, Emilie D, Simonneau G and Humbert M** (2007). Dendritic cell recruitment in lesions of human and experimental pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 29(3): 462-468.

- Petit I, Jin D and Rafii S** (2007). The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis. *Trends Immunol* 28(7): 299-307.
- Pietra GG, Capron F, Stewart S, Leone O, Humbert M, Robbins IM, Reid LM and Tudor RM** (2004). Pathologic assessment of vasculopathies in pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 43(12 Suppl S): 25S-32S.
- Pintos J, Parent ME, Richardson L and Siemiatycki J** (2012). Occupational exposure to diesel engine emissions and risk of lung cancer: evidence from two case-control studies in Montreal, Canada. *Occup Environ Med* 69(11): 787-792.
- Plumb DC** (1999). Veterinary Drug Handbook. White Bear Lake (USA), PharmaVet Publishing.
- Polverini PJ, Cotran PS, Gimbrone MA, Jr. and Unanue ER** (1977). Activated macrophages induce vascular proliferation. *Nature* 269(5631): 804-806.
- Pullamsetti SS, Doebele C, Fischer A, Savai R, Kojonazarov B, Dahal BK, Ghofrani HA, Weissmann N, Grimminger F, Bonauer A, et al.** (2012). Inhibition of microRNA-17 improves lung and heart function in experimental pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 185(4): 409-419.
- Pullamsetti SS and Schermuly RT** (2009). Endothelin receptor antagonists in preclinical models of pulmonary hypertension. *Eur J Clin Invest* 39 (Suppl 2): 3-13.
- Raper RF, Rogleff BR and Vandenberg RA** (1984). Subacute pulmonary hypertension due to carcinomatous microembolism. *Aust N Z J Med* 14(3): 271-273.
- Reddy SK, Parsons HA, Elsayem A, Palmer JL and Bruera E** (2009). Characteristics and correlates of dyspnea in patients with advanced cancer. *J Palliat Med* 12(1): 29-36.
- Redente EF, Orlicky DJ, Bouchard RJ and Malkinson AM** (2007). Tumor signaling to the bone marrow changes the phenotype of monocytes and pulmonary macrophages during urethane-induced primary lung tumorigenesis in A/J mice. *Am J Pathol* 170(2): 693-708.
- Ribatti D, Vacca A and Dammacco F** (2003). New non-angiogenesis dependent pathways for tumour growth. *Eur J Cancer* 39(13): 1835-1841.
- Rich S, Dantzker DR, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, Fishman AP, Goldring RM, Groves BM, Koerner SK, et al.** (1987). Primary pulmonary hypertension. A national prospective study. *Ann Intern Med* 107(2): 216-223.
- Riede U-N, Werner M and Freudenberg N** (2009). Basiswissen Allgemeine und Spezielle Pathologie. Heidelberg, Springer Medizin Verlag.
- RKI and GEKID, Eds.** (2012). Krebs in Deutschland 2007/2008. 8. Ausgabe. Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Berlin.
- Robbins IM, Barst RJ, Rubin LJ, Gaine SP, Price PV, Morrow JD and Christman BW** (2001). Increased levels of prostaglandin D(2) suggest macrophage activation in patients with primary pulmonary hypertension. *Chest* 120(5): 1639-1644.
- Roberts KE, Hamele-Bena D, Saqi A, Stein CA and Cole RP** (2003). Pulmonary tumor embolism: a review of the literature. *Am J Med* 115(3): 228-232.
- Robertson T and McMurtry I** (2004). Critical role of Ca²⁺-sensitization in acute hypoxic pulmonary vasoconstriction. Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction: Cellular and Molecular Mechanisms. J. X.-J. Yuan. Boston, MA, Kluwer Academic.
- Robertson TP, Ward JP and Aaronson PI** (2001). Hypoxia induces the release of a pulmonary-selective, Ca²⁺-sensitising, vasoconstrictor from the perfused rat lung. *Cardiovasc Res* 50(1): 145-150.
- Rodenhuis S, Slebos RJ, Boot AJ, Evers SG, Mooi WJ, Wagenaar SS, van Bodegom PC and Bos JL** (1988). Incidence and possible clinical significance of K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human lung. *Cancer Res* 48(20): 5738-5741.

- Rodriguez CP** (2012). Treatment implications of the new lung cancer staging system. *Cleve Clin J Med* 79 (Electronic Suppl 1): eS7-eS10.
- Rosenkranz S, Behr J, Ewert R, Ghofrani HA, Grunig E, Halank M, Hoeper MM, Leuchte HH, Olschewski H, Schmeisser A, et al.** (2011). [Right heart catheterization in pulmonary hypertension]. *Dtsch Med Wochenschr* 136(50): 2601-2616; quiz 2617-2620.
- Rubin LJ** (1997). Primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 336(2): 111-117.
- Ryan HE, Poloni M, McNulty W, Elson D, Gassmann M, Arbeit JM and Johnson RS** (2000). Hypoxia-inducible factor-1alpha is a positive factor in solid tumor growth. *Cancer Res* 60(15): 4010-4015.
- Sallusto F, Cella M, Danieli C and Lanzavecchia A** (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 182(2): 389-400.
- Savagner P** (2001). Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. *Bioessays* 23(10): 912-923.
- Savai R, Pullamsetti SS, Kolbe J, Bieniek E, Voswinckel R, Fink L, Scheed A, Ritter C, Dahal BK, Vater A, et al.** (2012). Immune and inflammatory cell involvement in the pathology of idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 186(9): 897-908.
- Savai R, Schermuly RT, Schneider M, Pullamsetti SS, Grimminger F, Seeger W and Banat GA** (2006). Hybrid-primed lymphocytes and hybrid vaccination prevent tumor growth of lewis lung carcinoma in mice. *J Immunother* 29(2): 175-187.
- Savai R, Wolf JC, Greschus S, Eul BG, Schermuly RT, Hanze J, Voswinckel R, Langheinrich AC, Grimminger F, Traupe H, et al.** (2005). Analysis of tumor vessel supply in Lewis lung carcinoma in mice by fluorescent microsphere distribution and imaging with micro- and flat-panel computed tomography. *Am J Pathol* 167(4): 937-946.
- Schermuly R and Grimminger F** (2008). [Update in basic research in the therapy of pulmonary arterial hypertension]. *Dtsch Med Wochenschr* 133 (Suppl 6): S170-172.
- Schriner RW, Ryu JH and Edwards WD** (1991). Microscopic pulmonary tumor embolism causing subacute cor pulmonale: a difficult antemortem diagnosis. *Mayo Clin Proc* 66(2): 143-148.
- Seije M and Bernstein IA, Eds.** (1980). Biochemistry of normal and abnormal epidermal differentiation. Tokyo, University of Tokyo Press.
- Shevach EM** (2001). Certified professionals: CD4⁺CD25⁺ suppressor T cells. *J Exp Med* 193(11): F41-46.
- Shields DJ and Edwards WD** (1992). Pulmonary hypertension attributable to neoplastic emboli: an autopsy study of 20 cases and a review of literature. *Cardiovasc Pathol* 1: 279-287.
- Shih JY and Yang PC** (2011). The EMT regulator slug and lung carcinogenesis. *Carcinogenesis* 32(9): 1299-1304.
- Shimada Y, Ishii G, Hishida T, Yoshida J, Nishimura M and Nagai K** (2010). Extratumoral vascular invasion is a significant prognostic indicator and a predicting factor of distant metastasis in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 5(7): 970-975.
- Sica G, Yoshizawa A, Sima CS, Azzoli CG, Downey RJ, Rusch VW, Travis WD and Moreira AL** (2010). A grading system of lung adenocarcinomas based on histologic pattern is predictive of disease recurrence in stage I tumors. *Am J Surg Pathol* 34(8): 1155-1162.
- Siegenthaler W and Blum HE, Eds.** (2006). Klinische Pathophysiologie, 9. Auflage. Stuttgart, Thieme.
- Silvestri GA, Littenberg B and Colice GL** (1995). The clinical evaluation for detecting metastatic lung cancer. A meta-analysis. *Am J Respir Crit Care Med* 152(1): 225-230.
- Simonneau G, Robbins IM, Beghetti M, Channick RN, Delcroix M, Denton CP, Elliott CG, Gaine SP, Gladwin MT, Jing ZC, et al.** (2009). Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 54(1 Suppl): S43-54.

- Singh S and Evans TW** (1997). Nitric oxide, the biological mediator of the decade: fact or fiction? *Eur Respir J* 10(3): 699-707.
- Sitbon O, Humbert M, Nunes H, Parent F, Garcia G, Herve P, Rainisio M and Simonneau G** (2002). Long-term intravenous epoprostenol infusion in primary pulmonary hypertension: prognostic factors and survival. *J Am Coll Cardiol* 40(4): 780-788.
- Smith CJ, Perfetti TA and King JA** (2006). Perspectives on pulmonary inflammation and lung cancer risk in cigarette smokers. *Inhal Toxicol* 18(9): 667-677.
- Smith EL, Hann DM, Ahles TA, Furstenberg CT, Mitchell TA, Meyer L, Maurer LH, Rigas J and Hammond S** (2001). Dyspnea, anxiety, body consciousness, and quality of life in patients with lung cancer. *J Pain Symptom Manage* 21(4): 323-329.
- Snyder LS, Harmon KR and Estensen RD** (1989). Intravascular lymphomatosis (malignant angioendotheliomatosis) presenting as pulmonary hypertension. *Chest* 96(5): 1199-1200.
- Soares FA, Pinto AP, Landell GA and de Oliveira JA** (1993). Pulmonary tumor embolism to arterial vessels and carcinomatous lymphangitis. A comparative clinicopathological study. *Arch Pathol Lab Med* 117(8): 827-831.
- Sobin LH, Gospodarowicz MK and Wittekind C, Eds.** (2009). TNM Classification of Malignant Tumours, 7th edition. Chichester, John Wiley & Sons.
- Somlyo AP and Somlyo AV** (1994). Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* 372(6503): 231-236.
- Song Y, Coleman L, Shi J, Beppu H, Sato K, Walsh K, Loscalzo J and Zhang YY** (2008). Inflammation, endothelial injury, and persistent pulmonary hypertension in heterozygous BMPR2-mutant mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295(2): H677-690.
- Springhouse, Ed.** (2002). Illustrated Manual of Nursing Practice, 3rd edition. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins
- Stearman RS, Dwyer-Nield L, Grady MC, Malkinson AM and Geraci MW** (2008). A macrophage gene expression signature defines a field effect in the lung tumor microenvironment. *Cancer Res* 68(1): 34-43.
- Steiner MK, Syrkina OL, Kolliputi N, Mark EJ, Hales CA and Waxman AB** (2009). Interleukin-6 overexpression induces pulmonary hypertension. *Circ Res* 104(2): 236-244.
- Steinman RM** (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9: 271-296.
- Stenmark KR, Davie N, Frid M, Gerasimovskaya E and Das M** (2006). Role of the adventitia in pulmonary vascular remodeling. *Physiology (Bethesda)* 21: 134-145.
- Stenmark KR, Davie NJ, Reeves JT and Frid MG** (2005). Hypoxia, leukocytes, and the pulmonary circulation. *J Appl Physiol* 98(2): 715-721.
- Stenmark KR, Durmowicz AG and Dempsey EC** (1995). Modulation of vascular wall cell phenotype in pulmonary hypertension. Pulmonary Vascular Remodelling. J. E. Bishop, G. L. Laurent and J. Reeves. London, Portland Press Ltd.
- Stenmark KR, Gerasimovskaya E, Nemenoff RA and Das M** (2002). Hypoxic activation of adventitial fibroblasts: role in vascular remodeling. *Chest* 122(6 Suppl): 326S-334S.
- Stenmark KR, Meyrick B, Galie N, Mooi WJ and McMurtry IF** (2009). Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297(6): L1013-1032.
- Storey BT, Pittman HK, Christian JF, Haisch CE and Verbanac KM** (2004). Characterization of Lewis lung clonal variants in a model of syngeneic pulmonary murine metastases. *Clin Exp Metastasis* 21(3): 265-273.
- Strange G, Playford D, Stewart S, Deague JA, Nelson H, Kent A and Gabbay E** (2012). Pulmonary hypertension: prevalence and mortality in the Armadale echocardiography cohort. *Heart* 98(24): 1805-1811.

- Su HM, Lin TH, Voon WC, Lee KT, Chu CS, Yen HW, Lai WT and Sheu SH** (2007). Correlation of Tei index obtained from tissue Doppler echocardiography with invasive measurements of left ventricular performance. *Echocardiography* 24(3): 252-257.
- Taichman DB and Mandel J** (2007). Epidemiology of pulmonary arterial hypertension. *Clin Chest Med* 28(1): 1-22, vii.
- Tanaka H, Shimizu K, Hayashi T and Shu S** (2002). Therapeutic immune response induced by electrofusion of dendritic and tumor cells. *Cell Immunol* 220(1): 1-12.
- Thibault HB, Kurtz B, Raheer MJ, Shaik RS, Waxman A, Derumeaux G, Halpern EF, Bloch KD and Scherrer-Crosbie M** (2010). Noninvasive assessment of murine pulmonary arterial pressure: validation and application to models of pulmonary hypertension. *Circ Cardiovasc Imaging* 3(2): 157-163.
- Tlsty TD and Coussens LM** (2006). Tumor stroma and regulation of cancer development. *Annu Rev Pathol* 1: 119-150.
- Tobias R, Skrodzki M and Schneider M** (2008). Kleintierkardiologie kompakt. Hannover, Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co.KG.
- Tong Q, Zheng L, Lin L, Li B, Wang D and Li D** (2006). Hypoxia-induced mitogenic factor promotes vascular adhesion molecule-1 expression via the PI-3K/Akt-NF-kappaB signaling pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol* 35(4): 444-456.
- Trahey M and McCormick F** (1987). A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants. *Science* 238(4826): 542-545.
- Travis WD** (2011). Pathology of lung cancer. *Clin Chest Med* 32(4): 669-692.
- Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, Beer DG, Powell CA, Riely GJ, Van Schil PE, et al.** (2011). International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 6(2): 244-285.
- Troppmair J, Cleveland JL, Askew DS and Rapp UR** (1992). v-Raf/v-Myc synergism in abrogation of IL-3 dependence: v-Raf suppresses apoptosis. *Curr Top Microbiol Immunol* 182: 453-460.
- Tuder RM** (2009). Pathology of pulmonary arterial hypertension. *Semin Respir Crit Care Med* 30(4): 376-385.
- Tuder RM, Chacon M, Alger L, Wang J, Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y, Cool CD, Bishop AE, Geraci M, Semenza GL, et al.** (2001). Expression of angiogenesis-related molecules in plexiform lesions in severe pulmonary hypertension: evidence for a process of disordered angiogenesis. *J Pathol* 195(3): 367-374.
- Tuder RM, Groves B, Badesch DB and Voelkel NF** (1994). Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *Am J Pathol* 144(2): 275-285.
- Tuder RM, Marecki JC, Richter A, Fijalkowska I and Flores S** (2007). Pathology of pulmonary hypertension. *Clin Chest Med* 28(1): 23-42, vii.
- U.S.-Public-Health-Service, Ed.** (1972). The health consequences of smoking. A report of the Surgeon General. Bethesda, MD, Public Health Service, Office of the Surgeon General; Report No.: DHEW Publication No. (HSM) 72-7516.
- Ulrich S, Nicolls MR, Taraseviciene L, Speich R and Voelkel N** (2008). Increased regulatory and decreased CD8+ cytotoxic T cells in the blood of patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Respiration* 75(3): 272-280.
- Ulyanova T, Scott LM, Priestley GV, Jiang Y, Nakamoto B, Koni PA and Papayannopoulou T** (2005). VCAM-1 expression in adult hematopoietic and nonhematopoietic cells is controlled by tissue-inductive signals and reflects their developmental origin. *Blood* 106(1): 86-94.
- Vaupel P** (2004). The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *Oncologist* 9 (Suppl 5): 10-17.
- Vaupel P** (2008). Hypoxia and aggressive tumor phenotype: implications for therapy and prognosis. *Oncologist* 13 (Suppl 3): 21-26.

- Vaupel P, Kallinowski F and Okunieff P** (1989). Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res* 49(23): 6449-6465.
- Veinot JP, Ford SE and Price RG** (1992). Subacute cor pulmonale due to tumor embolization. *Arch Pathol Lab Med* 116(2): 131-134.
- Vergadi E, Chang MS, Lee C, Liang OD, Liu X, Fernandez-Gonzalez A, Mitsialis SA and Kourembanas S** (2011). Early macrophage recruitment and alternative activation are critical for the later development of hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 123(18): 1986-1995.
- von Herbay A, Illes A, Waldherr R and Otto HF** (1990). Pulmonary tumor thrombotic microangiopathy with pulmonary hypertension. *Cancer* 66(3): 587-592.
- Vonk-Noordegraaf A and Galie N** (2011). The role of the right ventricle in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir Rev* 20(122): 243-253.
- Vonk-Noordegraaf A, Marcus JT, Gan CT, Boonstra A and Postmus PE** (2005). Interventricular mechanical asynchrony due to right ventricular pressure overload in pulmonary hypertension plays an important role in impaired left ventricular filling. *Chest* 128(6 Suppl): 628S-630S.
- Vonk MC, Sander MH, van den Hoogen FH, van Riel PL, Verheugt FW and van Dijk AP** (2007). Right ventricle Tei-index: a tool to increase the accuracy of non-invasive detection of pulmonary arterial hypertension in connective tissue diseases. *Eur J Echocardiogr* 8(5): 317-321.
- Wang Y, Haider H, Ahmad N, Zhang D and Ashraf M** (2006). Evidence for ischemia induced host-derived bone marrow cell mobilization into cardiac allografts. *J Mol Cell Cardiol* 41(3): 478-487.
- Warburg O** (1926). Über den Stoffwechsel der Tumoren. Berlin, Julius Springer.
- Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losick R and Cshlp I** (2011). Watson Molekularbiologie, 6. Auflage. München, Pearson Studium.
- Weiss L** (2000). Early concepts of cancer. *Cancer metastasis rev* 19: 205-217.
- Welsh CH, Hassell KL, Badesch DB, Kressin DC and Marlar RA** (1996). Coagulation and fibrinolytic profiles in patients with severe pulmonary hypertension. *Chest* 110(3): 710-717.
- Wensel R, Opitz CF, Anker SD, Winkler J, Hoffken G, Kleber FX, Sharma R, Hummel M, Hetzer R and Ewert R** (2002). Assessment of survival in patients with primary pulmonary hypertension: importance of cardiopulmonary exercise testing. *Circulation* 106(3): 319-324.
- WHO, Ed.** (2008). The Global Burden of Disease. 2004 Update. Geneva, World Health Organization Press.
- Willis RA** (1952). The Spread of Tumors in the Human Body, 2nd edition. London, Butterworths.
- Willis RA** (1973). The Spread of Tumors in the Human Body, 3rd edition. London, Butterworths.
- Wilson DM, Perkins SN, Thomas JA, Seelig S, Berry SA, Hamm TE, Jr., Hoffman AR, Hintz RL and Rosenfeld RG** (1989). Effects of elevated serum insulinlike growth factor-II on growth hormone and insulinlike growth factor-I mRNA and secretion. *Metabolism* 38(1): 57-62.
- Wilson DW, Segall HJ, Pan LC and Dunston SK** (1989). Progressive inflammatory and structural changes in the pulmonary vasculature of monocrotaline-treated rats. *Microvasc Res* 38(1): 57-80.
- Wilson K, Guardino J and Shapira O** (2001). Pulmonary tumor embolism as a presenting feature of cavoatrial hepatocellular carcinoma. *Chest* 119(2): 657-658.
- Woo EY, Yeh H, Chu CS, Schlienger K, Carroll RG, Riley JL, Kaiser LR and June CH** (2002). Cutting edge: Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. *J Immunol* 168(9): 4272-4276.
- Woodhouse EC, Chuaqui RF and Liotta LA** (1997). General mechanisms of metastasis. *Cancer* 80(8 Suppl): 1529-1537.

Wu X, Zhao H, Suk R and Christiani DC (2004). Genetic susceptibility to tobacco-related cancer. *Oncogene* 23(38): 6500-6523.

Yamaguchi O, Watanabe T, Nishida K, Kashiwase K, Higuchi Y, Takeda T, Hikoso S, Hirotani S, Asahi M, Taniike M, et al. (2004). Cardiac-specific disruption of the c-raf-1 gene induces cardiac dysfunction and apoptosis. *J Clin Invest* 114(7): 937-943.

Yamashita T, Ohneda O, Sakiyama A, Iwata F, Ohneda K and Fujii-Kuriyama Y (2008). The microenvironment for erythropoiesis is regulated by HIF-2alpha through VCAM-1 in endothelial cells. *Blood* 112(4): 1482-1492.

Yang D, Ed. (2009). RNA Viruses: Host Gene Responses to Infections. Singapur, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.

Yeo TC, Dujardin KS, Tei C, Mahoney DW, McGoon MD and Seward JB (1998). Value of a Doppler-derived index combining systolic and diastolic time intervals in predicting outcome in primary pulmonary hypertension. *Am J Cardiol* 81(9): 1157-1161.

Yoshizawa A, Motoi N, Riely GJ, Sima CS, Gerald WL, Kris MG, Park BJ, Rusch VW and Travis WD (2011). Impact of proposed IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma: prognostic subgroups and implications for further revision of staging based on analysis of 514 stage I cases. *Mod Pathol* 24(5): 653-664.

Yuan JX, Aldinger AM, Juhaszova M, Wang J, Conte JV, Jr., Gaine SP, Orens JB and Rubin LJ (1998). Dysfunctional voltage-gated K⁺ channels in pulmonary artery smooth muscle cells of patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation* 98(14): 1400-1406.

Yuan XJ, Wang J, Juhaszova M, Gaine SP and Rubin LJ (1998). Attenuated K⁺ channel gene transcription in primary pulmonary hypertension. *Lancet* 351(9104): 726-727.

Zhang S, Fantozzi I, Tigno DD, Yi ES, Platoshyn O, Thistlethwaite PA, Kriett JM, Yung G, Rubin LJ and Yuan JX (2003). Bone morphogenetic proteins induce apoptosis in human pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285(3): L740-754.

Zheng M, Dilly K, Dos Santos Cruz J, Li M, Gu Y, Ursitti JA, Chen J, Ross J, Jr., Chien KR, Lederer JW, et al. (2004). Sarcoplasmic reticulum calcium defect in Ras-induced hypertrophic cardiomyopathy heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286(1): H424-433.

Zimbarra Cabrita I, Ruisanchez C, Dawson D, Grapsa J, North B, Howard LS, Pinto FJ, Nihoyannopoulos P and Gibbs JS (2010). Right ventricular function in patients with pulmonary hypertension; the value of myocardial performance index measured by tissue Doppler imaging. *Eur J Echocardiogr* 11(8): 719-724.

Zucker S, Cao J and Chen WT (2000). Critical appraisal of the use of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer treatment. *Oncogene* 19(56): 6642-6650.

Zuurbier CJ, Emons VM and Ince C (2002). Hemodynamics of anesthetized ventilated mouse models: aspects of anesthetics, fluid support, and strain. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282(6): H2099-2105.

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich für die Hilfe bedanken, die ich während der Durchführung meiner Promotionsarbeit erfahren habe.

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Werner Seeger meinen Dank aussprechen, für seine zahlreichen, wertvollen Beiträge bei den wöchentlichen Labmeetings und dafür, dass ich am Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung arbeiten durfte.

Herrn Prof. Dr. Joachim Roth danke ich für die Übernahme der Betreuung am Fachbereich Veterinärmedizin, für die Durchsicht dieser Arbeit und die ununterbrochene Hilfsbereitschaft bei allen möglichen Fragen und Problemen.

Herrn Prof. Dr. Ralph Schermuly ebenfalls ein herzliches Dankeschön für die Möglichkeit, viele der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche in seinen Laboren am Excellence Cluster Cardio-Pulmonary System in Gießen durchgeführt haben zu dürfen. Zudem bedanke ich mich sehr für die Durchsicht meiner Arbeit, sowie für die hervorragende fachliche Betreuung.

Einen großen Dank auch an Herrn Dr. Rajkumar Savai, auf dessen Idee diese Arbeit basiert, dafür mich in seine Arbeitsgruppe aufgenommen zu haben, für die gute Zusammenarbeit und für sein großes Engagement. Zudem vielen Dank für die Durchsicht dieser Arbeit.

Ich möchte mich ebenfalls bei Herrn Dr. Bakytbek Kojonazarov bedanken, für seinen unermüdlichen Einsatz bei den echokardiographischen Untersuchungen und dafür zu wissen, wie man den Laboralltag der Doktoranden durch ein kleines Lächeln aufheitert.

Allen Mitarbeitern der AG Savai in Bad Nauheim sei zudem gedankt, für deren stetige Hilfe beim Genotypisieren, Bestellen, Färben, wissenschaftlichen Fragen und dem ominösen CAT-System. Alina Asafova, Nefertiti Elnikhely, Vanessa Golchert, Marianne Hoeck, Yanina Knepper, Anja Schmall und Aleks Tretyn, vielen lieben Dank!

Einen ganz besonderen Dank geht zudem an Ewa Bieniek, Lisa Fröhlich und Christina Vroom für ihre exzellente technische Unterstützung, dafür gute Lehrer gewesen zu sein und stets zu jedem Problem die passende Lösung parat zu haben.

Christin Baumann, Lisa Fröhlich, Katja Helmus, Michaela Lang und Christina Vroom möchte ich besonders danken für die herzliche und persönliche Atmosphäre in der physiologischen Abteilung der AG Schermuly. Es war eine Freude mit euch in einem solch harmonischen und humorvollen Kreis arbeiten zu dürfen. Der „katholische Ausländer“ ist dankbar in euch solch gute Freunde gefunden zu haben.

Meiner Familie, besonders meinen Eltern Viviane und Raymond Storn, ein unendlich großes Dankeschön für die Unterstützung und den Rückhalt, den ich während meines gesamten schulischen und beruflichen Werdegangs erfahren durfte. Meiner Mutter und meiner Schwester Debbie Storn möchte ich zudem herzlichst danken für die Durchsicht meiner Arbeit und ihre geduldige Hilfe. Debbie, herzlichen Dank, dass ich immer auf dich zählen kann! *Villmols Merci!*

Xavier Hever, vielen Dank für deine wertvollen Tipps und Tricks bei der Laborarbeit, dein Engagement bei der Durchsicht dieser Arbeit und dafür in allen Lebenslagen ein offenes Ohr für mich zu haben. *E ganz décke Merci!*



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6047-3



9 783835 196047 3